UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ANNÉE 1948 SÉRIE U, N° 130

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU

DIPLOME DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PHARMACIE

présentée et soutenue le Mars 1948

PAR

JACQUES LAINEY

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE QUELQUES TECHNIQUES ANALYTIQUES UTILISÉES EN BIOCHIMIE MÉDICALE

JURY :

Président : P. FLEURY
Examinateurs : M. GUILLOT
— J. COURTOIS

CENTRE DE DOCUMENTATION UNIVERSITAIRE
TOURNIER & CONSTANS
5, Place de la Sorbonne, 5
PARIS-V^e^
1948

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ANNÉE 1948 SÉRIE U, N° 130

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU

DIPLOME DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PHARMACIE

présentée et soutenue le Mars 1948

PAR

JACQUES LAINEY

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE QUELQUES TECHNIQUES ANALYTIQUES UTILISÉES EN BIOCHIMIE MÉDICALE

JURY :

Président : P. FLEURY
Examinateurs : M. GUILLOT
— J. COURTOIS

CENTRE DE DOCUMENTATION UNIVERSITAIRE
TOURNIER & CONSTANS
5, Place de la Sorbonne, 5
PARIS-Ve
1948

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION :

MM. RENÉ FABRE, *Doyen*, O. ✻, ✪ I.
MARCEL SOMMELET, *Assesseur*, ✻, ✪ I.
H.-J. LIONNET, *Secrétaire*, ✻, ✪ I.
L. JEANDEL, *Rédacteur*, ✪ A.

PROFESSEURS :

MM.	SOMMELET, ✻, ✪ I.	Chimie organique.
	FABRE, O. ✻, ✪ I.	Toxicologie.
	PICON, ✻, ✪ I.	Chimie minérale.
	DELABY, ✻, ✪ I.	Pharmacie chimique.
	MASCRE, ✻, ✪ I.	Botanique.
	SARTORY, C. ✻, ✪ I.	Microbiologie.
	FLEURY, ✻, ✪ I.	Chimie biologique.
	JANOT, ✪ I.	Pharmacie galénique.
	CHARONNAT, ✪ I.	Chimie analytique.
	VALETTE, ✪ I.	Zoologie appliquée.
	BEDEL, ✻, ✪ I.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
	PARIS	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
	GUILLOT	Physique.
	RAOUL	Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. ✻, ✪ I.

Professeurs honoraires :

MM. DELEPINE, O. ✻, ✪ I. et LEBEAU, O. ✻, ✪ I., Membres de l'Institut. PERROT, C. ✻, ✪ I., COUTIERE, O. ✻, ✪ I., BOUGAULT, O. ✻, ✪ I., LUTZ, ✻, ✪ I., GORIS, O. ✻, ✪ I., HERISSEY, O. ✻, ✪ I., LAUNOY, O. ✻, ✪ I.

MAITRES DE CONFERENCES :

MM.	GAUTIER, ✪ I.	Sciences physiques et chimiques.
	DOMANGE, ✪ I.	Sciences physiques et chimiques.
	CRETE	Sciences naturelles.
	COURTOIS	Sciences physiques et chimiques.
	MORETTE	Sciences physiques et chimiques.
Mlle	LAMBIN, ✪ I.	Sciences naturelles.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES :

MM.	CORRIEZ, ✪ I.	Physique.
	HARISPE, travaux pratiques de 1re année	Chimie générale et pharmaceutique.
	CAVIER	Biologie animale.
	TRUHAUT, ✻, ✪ A., travaux pratiques de 4e année....	Chimie biologique, Bromatologie et Pharmacie chimique.
	MOREAU	Chimie analytique.
	N.	Botanique.
	GERMAN (F.F.)	Microbiologie.

Bibliothécaire en chef : M. GARNIER, ✪ I.
Bibliothécaire : Mlle LAVAUD, ✪ A.

A Monsieur le Professeur P. FLEURY,

Professeur à la Faculté de Pharmacie,

Pharmacien-chef des Hôpitaux psychiâtriques de la Seine,

Qui a bien voulu diriger nos recherches et présider notre jury d'examen,
Hommage de respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur M. GUILLOT,

Professeur à la Faculté de Pharmacie,

Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

en témoignage de respectueuse gratitude.

A Monsieur J. COURTOIS

Maître de conférences à la Faculté de Pharmacie,

Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

respectueux hommage.

A la mémoire de

MON PERE,

Qui fut mon premier Maître en Pharmacie,

Hommage filial.

A MA MERE

A MES PARENTS

A MES AMIS

INTRODUCTION

Dans le but de faciliter le travail dans un laboratoire de biochimie médicale, M. le Professeur FLEURY a fait paraître, il y a déjà un certain temps, ses Fiches techniques de Chimie biologique. Elles ont un but essentiellement pratique et permettent d'exécuter facilement et rapidement les techniques nécessitées par telle recherche ou tel dosage de corps normaux ou pathologiques. La parution de Suppléments à ces Fiches techniques a été justifiée à la suite de l'amélioration des méthodes jusque-là employées ou de la création de techniques entièrement nouvelles.

Ce travail a été fait dans un même but essentiellement pratique. Nous avons cherché à rendre certaines techniques plus maniables et plus rapides. Nous avons également étudié quelques techniques nouvelles et nous en avons apprécié la valeur par comparaison avec celles déjà existantes. Enfin nous avons essayé de mettre sur pied des méthodes nouvelles, ayant pour but de rendre certains dosages sinon plus rapides, du moins plus faciles à exécuter.

Nous avons ainsi été amené au cours de ce travail à envisager :

I - Dans l'urine:

a) la recherche des barbituriques.

b) la recherche et, éventuellement, l'appréciation quantitative des pigments biliaires.

c) la recherche du sang.

d) la recherche et le dosage de l'albumine urinaire.

II - Dans le sang:

- la détermination de la réserve alcaline.

Avant d'aborder l'exposé de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à M. le Professeur P. FLEURY qui nous a fait le grand honneur de nous accueillir dans son laboratoire. Dans le domaine complexe de la chimie analytique biologique, il nous a fait profiter de sa très grande expérience et de sa compétence indiscutée.

Nous lui devons d'avoir pu mener à bien ce travail, totalement réalisé sous sa direction. Nous sommes heureux de lui exprimer notre profond attachement et notre respectueuse gratitude. Qu'il nous soit aussi permis de le remercier d'avoir accepté de présider notre jury d'examen.

Nous prions M. le Professeur M. GUILLOT, qui a bien voulu examiner cette thèse, d'accepter l'expression de nos sentiments de respectueuse reconnaissance.

Nous remercions M. J. COURTOIS, qui a contribué, avec tant de compétence et de dévouement, à la mise au point de ce travail et fait partie de notre jury de thèse. Nous le prions de trouver ici l'expression de nos sentiments respectueux et de notre profond attachement.

Nous tenons à évoquer la mémoire de M. G. POIROT, qui s'est intéressé à nos recherches.

Il nous est agréable de remercier M. E. CATTELAIN, assistant de la Chaire, qui nous a facilité l'exécution matérielle de ce travail.

Chapitre I

RECHERCHE DES BARBITURIQUES DANS L'URINE.

De nombreuses méthodes ont été proposées jusqu'ici pour la recherche des barbituriques dans l'urine. Et divers auteurs ont montré, par des études comparatives, quelles étaient les plus rapides ou les plus sensibles. Les unes et les autres ont, en effet, leur intérêt selon le but poursuivi: recherche ou dosage des barbituriques.

Le point de départ de ce travail fut la technique de FABRE et CISMARU (1) qu'on trouve détaillée dans les fiches de P. FLEURY (2). L'emploi de cette technique, utilisant une méthode de relargage par le sulfate d'ammonium mise au point par LACHAUX (3), nous a paru justifié dans les conditions un peu particulières où nous avons voulu opérer.

On sait que l'absorption massive des barbituriques est assez fréquemment utilisée par les désespérés dans un but de suicide, et cela, malgré la sévère réglementation concernant la délivrance de ces produits. L'action des barbituriques s'opère rapidement par la voie sanguine, grâce à une fixation élective sur les centres nerveux (FABRE et FREDET 4). Il s'ensuit assez vite une prostration profonde qui ne tarde pas à faire place à un état comateux. En général, quelque temps s'étant écoulé entre l'empoisonnement et la découverte du suicide, c'est dans ce dernier état qu'on trouvera le malade. Dans ces conditions, lors de l'admission de ce dernier à l'hôpital, il y a lieu de connaître aussi rapidement que possible, au moyen d'une analyse appropriée, la nature du poison.

D'autre part, l'étude de l'élimination du toxique par la voie urinaire nous montre que, dans le cas d'absorption massive, le taux de cette élimination est assez élevé. LACHAUX (5) insiste sur ce fait et LAGARCE (6) cite un cas où la concentration urinaire,

qui était de 1 gr.21 par litre au début de l'émission, était encore de 0 gr.91 le lendemain. Les taux d'élimination sont donc, dans ce cas particulier, bien supérieurs à ceux qu'on peut rencontrer pendant un traitement barbiturique et qu'on estime couramment à 0 gr.10 environ par litre et même moins. L'utilisation d'une technique encore sensible à des concentrations assez élevées (de l'ordre de 0.15g à 0.20g. par litre) semble donc justifiée ici: une réponse positive permettra de conclure à l'intoxication et d'écarter systématiquement l'hypothèse d'un simple traitement barbiturique. Sinon, on conclurait à un coma d'une autre origine, contre lequel la strychnine, couramment employée comme antidote des barbituriques, risquerait d'être dangereuse.

Les principales techniques proposées ces dernières années ont été surtout utilisées pour l'étude de l'élimination des barbituriques dans l'urine. Elles s'inspirent de la méthode de STAS-OTTO dans laquelle on retrouve le toxique après l'évaporation de "l'éther acide". En général elles comportent les 3 opérations suivantes: extraction, purification, caractérisation.

L'extraction se fait à partir de l'urine acide, au moyen d'un solvant volatil tel que l'éther: FLEURY et GUINNEBAULT (7), FABRE (8), PESEZ (9), GREEN et ses collaborateurs (10), KOZELKA et ses collaborateurs (11), GRIFFON et LE BRETON (12), HERWICK (13); l'éther acétique: VAN ITALLIE et STEENHAUER (14); ou le chloroforme: BODENDORF (15), INDA (16), MANCINI et PECCIARINI (17).

Parfois l'urine est préalablement déféquée au moyen de réactifs divers: acétate de plomb basique (FABRE 18), ou neutre de COURTONNE (FLEURY et GUINNEBAULT 19 ; FOUCHET 20 ; VAN ITALLIE et STEENHAUER 21); ferrocyanure de potassium et acétate de zinc (PAGET et DESODT 22; DESODT 23; PAGET et TILLY 24; THIERY 25).

Les extraits obtenus fournissent, après évaporation, des résidus plus ou moins colorés. Ceux-ci peuvent, après dissolution dans l'eau, être purifiés au moyen de charbon activé (DESODT 26; FABRE et FREDET 27).

D'autres techniques plus récentes utilisent la propriété, signalée par TABERN et SHELBERG (28), que possède le charbon activé d'adsorber les barbituriques par agitation avec l'urine acide. Ceux-ci sont ensuite élués au moyen de solvants organiques divers: mélange d'éther et d'éther de pétrole (BRUNDAGE et GRUBER 29); éther seul (MASCRE 30); acétone (PAGET et TILLY 31); chloroforme (MOHRSCHULTZ 32); alcool tartrique (CATTABENI 33).

Les résidus obtenus après évaporation des solutions purifiées servent à la caractérisation ou à l'identification des barbituriques. On emploie, dans ce but, des réactions de coloration (PARRI 34) ou de précipitation (VAN ITALLIE et VAN DER VEEN 35). L'identification se fait par examen direct après sublimation (LOBO 36) ou par détermination du point de fusion (FABRE 37).

Lors de l'utilisation de ces méthodes, on se heurte souvent à bien des difficultés et on leur reproche plusieurs inconvénients qui ont été mis en lumière par GRIFFON et LE BRETON (38). Notons que l'emploi des charbons activés, tant à la phase de l'extraction qu'à celle de la purification, a été vivement critiqué du fait de leur action inconstante. (TILLY 39; PAGET et TILLY 40).

La technique de FABRE et CISMARU (41), qui nous a paru répondre le mieux à nos besoins, nous semble pouvoir être simplifiée. En effet, après solubilisation dans l'acétone du produit relargué par le sulfate d'ammonium, il est nécessaire de faire subir à la portion acétonique obtenue une dessiccation sur chlorure de calcium. Cette dessiccation, qui se double d'ailleurs d'une sorte de défécation du fait de l'insolubilisation de nombreux produits, doit être assez prolongée si on veut qu'elle soit efficace. Dans ces conditions, le résidu obtenu est assez pur pour qu'on puisse pratiquer directement une réaction de coloration, mais la durée totale de l'opération se trouve singulièrement accrue, ce qui nous éloigne du but proposé (de plus, les auteurs suggèrent, en cas de purification insuffisante, de recourir à la sublimation).

De toute évidence, ces opérations prolongent la recherche et retardent le diagnostic. Aussi nous avons cherché à diminuer le temps de dessiccation et à obtenir plus rapidement des résidus d'évaporation suffisamment purifiés. Il devient possible de pratiquer directement, dans tous les cas, la réaction de caractérisation. Ayant retenu le principe du relargage, puis de l'extraction acétonique, il nous a paru possible d'agir sur l'extrait obtenu en le purifiant au moyen d'éther de pétrole. Ce produit, que MEILLERE (42) emploie pour l'extraction du beurre dans le lait, devait, par action physique, opérer une sorte de second relargage de l'eau et des produits hydrosolubles. S'il ne nous a pas été possible d'obtenir un relargage total, nous croyons cependant avoir réalisé une purification suffisamment poussée pour qu'on puisse proposer la technique ci-dessous:

TECHNIQUE PROPOSEE

Réactifs employés.

1 - Acide sulfurique environ 10 N (acide sulfurique d=1.83 additionné de 3 volumes d'eau).

2 - Solution de violet de méthyle à 0,05 p.100.

3 - Acétone.

4 - Sulfate d'ammonium cristallisé.

4bis - Sulfate d'ammonium finement pulvérisé.

5 - Ether de pétrole (distillant entre 35° et 50°).

6 - Chlorure de calcium desséché en petits fragments (conservé en flacon paraffiné ou en flacon à bouchon émeri graissé).

7 - Solution de nitrate de cobalt à 1 p.100 dans l'alcool éthylique absolu, ou d'acétate de cobalt à 1 p.100 dans l'alcool méthylique pur.

8 - Solution de diéthylamine à 2 p.100 dans l'alcool absolu.

Mode opératoire.

1ère Phase - Extraction - Dans un flacon de 125 cc, mesurer 50 cc d'urine (si l'on ne dispose que d'un volume d'urine plus petit, les quantités de réactif seront réduites proportionnellement) et acidifier à un pH voisin de I (à vérifier au moyen du violet de méthyle) par l'acide sulfurique dilué (environ 1 cc). Ajouter 25 cc. d'acétone, mélanger, puis dissoudre dans le mélange, par agitation prolongée, 20 gr. de sulfate d'ammonium cristallisé. Lorsque la dissolution sera totale, ajouter 10 gr. de sulfate d'ammonium soigneusement pulvérisé. Agiter jusqu'à dissolution pratiquement complète. Verser la totalité de la solution dans une ampoule à décanter de 250 cc. et laisser reposer jusqu'à séparation des 2 couches (3 à 4 minutes); évacuer par le robinet la portion aqueuse inférieure.

2ème Phase - Déshydratation - Verser alors 10 cc. d'éther de pétrole par la partie supérieure de l'ampoule et agiter vigoureusement pendant deux ou trois minutes jusqu'à ce que la séparation des deux phases liquides se fasse presque instantanément. Evacuer par la partie inférieure la nouvelle couche aqueuse et verser la couche éthéro-acétonique par le haut de l'ampoule dans un flacon d'Erlenmeyer contenant 10 à 12 gr. de chlorure de calcium desséché en petits fragments. Boucher, laisser en contact pendant 10 minutes en agitant une dizaine de fois pendant ce temps.

3ème Phase - Caractérisation - Décanter sur un petit filtre et recueillir le filtrat dans une petite capsule en porcelaine. Evaporer au B.M. (sans flamme - eau vers 80°-90°). Reprendre le résidu d'évaporation par 0 cc.50 de la solution du sel de cobalt, puis faire tomber dans la solution ainsi obtenue I ou II gouttes de la solution de diéthylaminè : l'apparition instantanée d'une coloration violette indique la présence d'un barbiturique.

ETUDE CRITIQUE ET JUSTIFICATION DU PROCEDE.

Nous étudierons, avant le traitement de l'urine, le mode d'action de l'éther de pétrole dans les conditions de l'opération.

I - ACTION DE L'ETHER DE PETROLE.

Nous avons opéré de la manière suivante : 50 cc d'eau et 25 cc d'acétone ont été traités par 30 gr. de sulfate d'ammonium. Après décantation dans une ampoule, la couche supérieure recueillie (soit 31 cc), composée en première approximation d'acétone et d'eau, est traitée par de l'éther de pétrole en quantités variables suivant les essais. Après agitation et nouvelle décantation, la couche supérieure éthéro-acétonique est de nouveau recueillie et mesurée par simple différence. On en déduit, d'une manière approchée, la quantité d'acétone extraite.

ESSAIS Nos	1	2	3	4	5	6	7
mélange traité	31cc	31cc	31cc	31cc	31cc	31cc	31cc
Ether de pétrole	5	10	15	20	25	50	75
Portion éthéro-acétonique relarguée	7,8	15,2	21,8	28,1	34,1	64	91,5
Acétone extraite	2,8	5,2	6,8	8,1	9,1	14	16,5

L'examen du tableau précédent nous montre que, pour extraire les 2/3 environ (essais nos 6 et 7) de l'acétone mise en oeuvre, il est nécessaire d'employer des quantités très importantes d'éther de pétrole. Cela nous entraîne, en fin d'opération, à évaporer beaucoup trop de liquide. Aussi avons-nous cherché à réduire ce volume d'éther de pétrole en favorisant le relargage de l'acétone. L'éther est donc mis en présence du mélange relargué en même temps qu'une petite quantité de sulfate d'ammonium (que nous avons fixée à 5 gr, compte tenu de la portion d'eau entrainée avec l'acétone et de la solubilité du sel dans l'eau). Dans ces conditions, l'extraction de l'acétone se trouve sensiblement améliorée.

ESSAIS Nos	1	2	3
mélange traité	31 cc	31 cc	31 cc
sulfate d'ammonium	5 gr	5 gr	5 gr
éther de pétrole	5 cc	10 cc	15 cc
mélange éthéro-acétonique relargué	28	33,5	37,5
acétone extraite	23	23,5	22,5

L'emploi de 10 cc d'éther de pétrole permet alors d'extraire environ 94 pour cent de l'acétone contenue dans la prise d'essai.

Enfin le même essai à blanc, effectué cette fois en mélangeant successivement :

50 cc d'eau

25 cc d'acétone

35 gr. de sulfate d'ammonium

10 cc d'éther de pétrole,

donne, après décantation et séparation, une fraction acétonique de 33 cc, soit, dans les mêmes conditions que précédemment, 23 cc d'acétone extraite (92 p.100).

Dès lors, il nous a paru possible d'opérer, d'une manière simple, une extraction très convenable de l'acétone en opérant sur une urine normale. Déjà un premier essai sur une solution de véronal à 25 mg. pour 100 cc nous avait permis d'apprécier l'importance du résidu obtenu après évaporation du mélange éthéro-acétonique : il était de 55 mg. environ (pour une prise d'essai de 12 mg.5 de véronal) et contenait une notable proportion de sulfate d'ammonium. Le traitement de la même urine sans véronal nous a donné, dans les mêmes conditions, un résidu de 69 mg.

Malheureusement, par la suite, il nous fut impossible de confirmer l'emploi de ces méthodes. En

effet, dans tous les cas, la présence d'un excès de sulfate d'ammonium provoquait le relargage des produits inertes et notamment des pigments urinaires qui passaient de la phase aqueuse dans la phase éthéro-acétonique. Dans ces conditions, la coloration des résidus était telle (résidus de 80 à 125 mg. pour une prise d'essai de 50 cc d'urine, contre 45 à 63 mg. si on n'emploie pas d'excès de sulfate d'ammonium) qu'il aurait été impossible d'y retrouver la moindre trace de barbiturique par les techniques habituelles de coloration.

C'est pourquoi, après avoir cherché à diminuer au maximum le nombre des manipulations, nous avons été conduit, en vue de réduire la portion "inerte" des résidus d'évaporation, à adopter la technique que nous venons de décrire, qui est plus proche de celle de FABRE et CISMARU (43) et que nous allons justifier ci-après :

II - TRAITEMENT DE L'URINE.

Le procédé d'extraction des barbituriques de l'urine, tel que nous l'avons décrit, fournit, après évaporation de la solution éthéro-acétonique, des résidus dont nous avons apprécié l'importance par pesée. Nous avons également tenu compte de leur coloration propre et de l'intensité de la réaction de PARRI (44). C'est sur l'ensemble de ces deux faits: importance et coloration des résidus, que nous nous sommes basés pour justifier les différentes phases de la technique adoptée.

1ère Phase - acidification, saturation.

Selon les divers auteurs, il semble que l'acidité de l'échantillon à analyser peut varier dans des proportions assez larges. Nous avons obtenu des résultats peu sensibles au pH, à partir de 50 cc d'urine :

	Poids du résidu
pH = 1	26,2 mg.
pH = 2	31,8 mg.
pH = 6	28,8 mg.

Une forte acidité, voisine de pH=1, semble cependant permettre la diminution du résidu inerte.

Nous n'avons pu améliorer l'extraction en saturant l'urine de sulfate d'ammonium et en la filtrant avant de la traiter par l'acétone : si cette filtration permet en effet d'éliminer une grosse partie des pigments, elle a par contre l'inconvénient, comme l'a montré LACHAUX (45), de retenir sur le filtre une partie des barbituriques qui se trouve ainsi relarguée.

D'autre part, la défécation de l'urine à l'acétate neutre de plomb (réactif de COURTONNE) préférable à l'acétate basique (FLEURY et GUINNEBAULT 46), n'a pas donné de résultats plus heureux. La diminution des résidus est très sensible, mais les filtrations successives auxquelles on se trouve astreint éliminent presque totalement les barbituriques du filtrat à traiter.

2ème phase : extraction des barbituriques.

Elle s'effectue facilement au moyen de l'acétone qui s'empare d'une portion de l'eau et de matières inertes. L'intervention de l'éther de pétrole a pour but d'éliminer une grande partie de ces dernières. En réalité il entraine, par une action simplement physique, une partie de l'acétone et des produits qui y sont solubilisés, notamment les barbituriques. La quantité d'éther mise en jeu peut être assez faible (10 cc), si on considère le taux d'extraction de l'acétone qui est différent ici, de celui trouvé avec l'eau. Il est en effet de 72 pour cent en présence de sulfate d'ammonium, et 40 pour cent sans sulfate d'ammonium. Etant donné la concentration de l'urine en barbiturique, ce pourcentage est suffisant pour permettre la caractérisation finale.

Nous recommandons une vive agitation lors de l'extraction éthérée, afin de détruire l'émulsion relativement stable qui se forme au début de l'opération.

3ème phase - purification du mélange éthéro-acétonique.

Il est possible de parfaire la dessiccation de ce mélange, recueilli à l'état incolore ou presque. Le passage sur un desséchant quelconque permet d'éliminer les traces d'eau qui auraient pû être entraînées par l'acétone, lors de l'extraction éthérée.

Nous avons essayé d'employer du chlorure de calcium seul, ou un mélange à parties égales de chlorure de calcium et de sulfate de sodium anhydre, ce dernier produit étant préconisé par certains auteurs (FABRE et FREDET 47).

Nous avons opéré sur une urine normale additionnée de 40 mg. de véronal pour 100 cc. Après dessiccation et évaporation, nous avons pratiqué la réaction de caractérisation, telle qu'elle est décrite plus haut, sur les résidus obtenus de façon différente : 1°) selon la méthode de FABRE et CISMARU; 2°) selon notre méthode utilisant l'extraction à l'éther de pétrole en présence du sulfate d'ammonium, et la dessiccation au moyen : a) d'un mélange à parties égales de chlorure de calcium et de sulfate de sodium; b) de chlorure de calcium seul; 3°) selon notre méthode telle qu'elle est décrite plus haut.

Réaction de PARRI

1	-
2 a	-
2 b	+
3	+ +

Le chlorure de calcium donne donc les meilleurs résultats en vue de la caractérisation des barbituriques, même dans de mauvaises conditions comme en 2 b. L'emploi du sulfate de sodium anhydre est limité, du fait qu'il retient, par imprégnation, une notable proportion du mélange éthéro-acétonique.

Nous avons fixé à dix minutes le temps de la dessiccation, d'après les résultats suivants, obtenus en ne faisant varier que le facteur temps :

Poids des résidus rapportés à 30 cc de liqueur acétonique

5 min.	37.2 mg.
10 min.	33.4
20 min.	32.8
40 min.	32.8

4ème phase - caractérisation des barbituriques.

Elle s'effectue directement sur le résidu d'évaporation de la solution éthéro-acétonique. Celui-ci peut être repris par l'alcool absolu : la solution obtenue est ensuite additionnée de quantités fixes de réactifs. La teinte obtenue est comparée à celle fournie, dans les mêmes conditions, par une solution de barbiturique dans l'alcool absolu.

Mais ici la solution alcoolique obtenue à partir du résidu peut déjà présenter une teinte propre dûe à des pigments: de la sorte, à la dilution où on opère, il est difficile d'apprécier la différence de teinte dûe à la réaction du barbiturique.

Nous préférons, pour faciliter la lecture de la réaction, reprendre le résidu directement par la solution de nitrate de cobalt. Il devient alors très facile d'apprécier le changement de couleur survenu dans le milieu par addition d'une ou deux gouttes de la solution de diéthylamine. Il se forme instantanément une coloration violette en présence des barbituriques, ou, en leur absence, un précipité bleuâtre.

CONCLUSIONS

Nous avons comparé cette méthode de recherche des barbituriques dans l'urine à une méthode beaucoup plus sensible: celle de GRIFFON et LE BRETON (49), permettant de retrouver moins de 100 mg. de barbiturique par litre d'urine.

Nous avons pu, d'une part, confirmer des cas de coma barbiturique. D'autre part, dans le cas de traitement barbiturique (cas de malades ayant reçu 3 injections de 0gr.10 de gardénal) où la présence de doses faibles a été révélée par le procédé de GRIFFON et LE BRETON, notre méthode a donné une réponse négative.

Nous pensons ainsi avoir mis au point une méthode permettant de confirmer le diagnostic de coma barbiturique. Les doses élevées (limite de sensibilité = 0,15 à 0gr.20 par litre) auxquelles nous opérons permettent d'écarter l'hypothèse du simple traitement barbiturique. Enfin, plus rapide (30 à 40 minutes environ) que la méthode de FABRE et CISMARU (50), elle permet au clinicien d'appliquer immédiatement le traitement convenable.

BIBLIOGRAPHIE

15- BODENDORF (K.) - Arch. d. Pharm. 1932-270-290

29- BRUNDAGE (J.T.) et GRUBER (C.M.) - J. Pharm. exp. Ther. 1937-59-379

33- CATTABENI (C.M.) - Diagn. Tec. lab. Napoli 1939-10-39

23-26- DESODT (C.) - Thèse Doct. Univ.(Pharmacie) Nancy 1933

8-18-37- FABRE (R.) - J. Pharm. Chim. 1922-(8)-26-241

1-41-43-48- FABRE(R.) et CISMARU(A.) - J. Pharm. Chim. 1940-(9)-1-137

4-27-47- FABRE(R.) et FREDET(P.) - J. Pharm. Chim. 1925-(8)-2-321

2- FLEURY (P.) - Fiches techniques de Chimie biologique - voir urine - 28 - Edit. VEGA, Paris.

7-19-46- FLEURY(P.) et GUINNEBAULT(E.) - C.R. Soc. Biol. 1925-93-1508

20- FOUCHET (M.) - J. Pharm. Chim. 1934-(8)-20-403

10- GREEN(M.W.), VEITCH(F.P.) et KOPPANYI(T.) - J. Amer. Pharm. Assoc. 1943-32-309

12-38-49- GRIFFON(H.) et LE BRETON(R.) - J. Pharm. Chim. 1938-(8)-28-49

16- INDA(C.) - Rev. Fac. Cienc. quim. La Plata 1942-17-117, d'après Ch. Abst. 1944-38-(2)-3681

13- HERWICK (R.P.) - Arch. intern. Pharmacodyn. 1933-45-160

11- KOZELKA (F.L.), NELSON(D.E.) et TATUM(H.J.) - J. Pharmacol. 1939-67-71

3-5-45- LACHAUX(M.) - Thèse Doct. Univ. (Pharmacie) Paris 1938

6- LAGARCE(F.) - Thèse Doct. Univ. (Pharmacie) Paris 1930

36- LOBO(R.S.)- Thèse Doct. Univ. (Pharmacie) Paris 1934

17- MANCINI(M.A.) et PECCIARINI(E.) - Biochim. Terap. sper. 1939-26-119

30- MASCRÉ(M.), MAILLARD(G.) et LOISEAU(J.) - Bull. Sc. Pharm. 1940-47-281

42- MEILLÈRE(G.)- J. Pharm. Chim. 1919-(7)-20-150

32- MOHRSCHULTZ(W.)- Munch. med. Woch. 1934-81-672

22- PAGET(M.) et DESODT(C.) - J. Pharm. Chim. 1933-(8)-18-207

24-31-40- PAGET(M.) et TILLY(F.) - Bull. Soc. Chim. biol. 1941-23-1381

34-44- PARRI(W.) - Boll. Chim. Farm. 1924-63-401

9- PESEZ(M.) - J. Pharm. Chim. 1938-(8)-28-69

28- TABERN(D.L.) et SHELBERG(E.F.) - J. Amer. chem. Soc. 1933-55-328

25- THIERY(M.) - J. Pharm. Chim. 1921-(8)-23-494

39- TILLY(F.) - Thèse Doct. Univ. (Pharmacie) Nancy 1937

14-21- VAN ITALLIE(L.) et STEENHAUER(A.J.) - Pharm. Weekbl. 1921-58-1062

35- VAN ITALLIE(L.) et VAN DER VEEN (A.L.) - J. Pharm. Chim. 1919-(8)-20-337

Chapitre II

I - RECHERCHE DES PIGMENTS BILIAIRES DANS L'URINE.

Parmi toutes les techniques qui ont été préconisées pour effectuer, de la meilleuremanière possible, la recherche des pigments biliaires dans l'urine, celle de GRIMBERT (1) est, sans contredit, la plus utilisée depuis une quarantaine d'années. Cette technique représentait déjà à l'époque une synthèse de plusieurs méthodes: JOLLES (2), HAMMARSTEN (3) et SALKOWSKI (4), parmi les quelque vingt procédés utilisés jusque là. Cependant, depuis cette date, de nombreuses techniques ont été mises au point, ainsi qu'en font foi les nombreuses citations qu'on peut relever dans la remarquable thèse de LACHAUX (5), sans oublier les notes diverses qui ont été publiées postérieurement.

Jusqu'ici, la recherche des pigments biliaires dans l'urine a reposé sur la détection de la bilirubine et de son produit d'oxydation: la biliverdine, au moyen de deux procédés :

1) - oxydation de la bilirubine en biliverdine et caractérisation de cette dernière par la teinte verte qu'elle communique à divers solvants. Cette recherche tient compte de l'ensemble bilirubine-biliverdine contenu dans l'urine.

2) - transformation de la bilirubine en azo-bilirubine avec production d'une teinte violette. Le taux de biliverdine n'est pas mesuré par cette technique: il est donc nécessaire, étant donnée la destruction rapide de la bilirubine, d'opérer sur une urine récemment émise, si on veut estimer l'intensité de l'élimination des pigments biliaires. En outre, un tel procédé présente l'inconvénient de n'être pas sensible: la présence de substances gênantes, lors des périodes critiques de début et de fin d'ictère, limite beaucoup son emploi.

Nous rappellerons brièvement le principe des techniques par oxydation, nous réservant simplement de mentionner les plus récentes. On sait qu'elles opèrent: soit directement sur l'urine, soit sur le pigment isolé par précipitation ou par extraction.

A - Directement sur l'urine, au moyen des réactifs suivants:

1 - acide nitrique fumant, seul.
2 - acide nitrique, puis acide sulfurique (sur l'urine concentrée).
3 - nitrite de sodium et acide sulfurique.
4 - acide chromique ou bichromate de potassium.
5 - nitrite de sodium seul, ou après acidification à l'acide p-toluène sulfonique: MAHER (6).
6 - iode ou brome.
7 - persulfate d'ammonium.
8 - chlorate de potassium.
9 - perchlorure de fer et acide chlorhydrique ou acétique.
10 - acides chlorhydrique et nitrique, puis addition d'alcool.
11 - acide chlorhydrique et alcool avec de l'eau oxygénée.
12 - acide trichloracétique.
13 - acide acétique et chlore.
14 - ammoniaque: MINIACI (7).

B - Après isolement des pigments:

a) par précipitation avec les réactifs suivants:

1 - sels de baryum, puis emploi du réactif de FOUCHE: HAWKINSON et ses collaborateurs (8), MARSH (9).
2 - sels basiques de plomb.
3 - sulfate d'ammonium à saturation (relargage).
4 - urates.
5 - chlorure de zinc.
6 - lait de chaux.
7 - chlorure de baryum ou de calcium, après addition de carbonate de sodium ou de lessive de soude.
8 - hydrates alcalino-terreux; sulfures humides de plomb, de bismuth ou de cuivre; précipités d'alcaloides.

9 - talc, puis réactif de FOUCHE ou acide nitrique: NAUMANN (10); kaolin, aluminate de plomb, plâtre.
10 - gel de silice: YUDKIN (11).
11 - chlorure de sodium et ammoniaque.

b) par extraction au chloroforme.

Nous signalerons enfin :

1 - la précipitation par la baryte, suivie d'une diazoréaction: RUBINO et VOJEDOVSKY (12).
2 - l'emploi du bleu de méthylène: MYERS* (13).

Dans l'ensemble de ces méthodes, on s'est efforcé, sans y avoir toujours réussi, d'améliorer la réalisation de la technique de recherche des pigments biliaires, tant au point de vue de la rapidité que de la facilité d'exécution. Il nous a paru utile de nous rallier à cette tendance et, malgré toute la valeur de la méthode de GRIMBERT éprouvée par un usage prolongé, on peut lui reprocher quelques inconvénients sous ce rapport. La durée de la recherche est assez longue, du fait de la centrifugation. De plus, la lecture finale de la réaction qui est nette le plus souvent, reste dans certains cas douteuse: on se trouve en effet dans la nécessité d'apprécier, pour un même résultat, des colorations assez diverses, parce qu'on n'atteint pas à chaque fois le même stade d'oxydation de la bilirubine.

Aussi, nous avons cherché à améliorer encore la technique de cette recherche et nous avons étudié dans ce but deux méthodes, de publication plus ou moins récente. Elles opèrent toutes deux selon le procédé par oxydation, suivant une technique particulière. Nous décrirons donc brièvement leurs techniques avant d'en aborder l'étude critique.

---

*) Dans une note publiée en 1935, BELAIRE (14) a montré que ce procédé n'avait pas de base scientifique: en effet il ne permet d'apprécier que la superposition des teintes de l'urine et de la solution de bleu de méthylène, sans qu'il y ait pour cela réaction spécifique vis-à-vis de la bilirubine.

METHODE DE GRIMBERT (15)

Principe - La bilirubine est précipitée de l'urine, à l'état de sel de baryum. Elle est ensuite libérée de ses combinaisons par l'alcool chlorhydrique. Après oxydation par l'eau oxygénée, la bilirubine est caractérisée par la teinte verte qu'elle communique à l'alcool.

Technique - Mélanger (urine..... 10 cm3
)chlorure de baryum
(à 10 pour cent..... 5 cm3

Agiter. Centrifuger. Décanter. Laver le précipité avec 2 cm3 d'eau, puis le mettre en suspension dans 5 cm3 d'alcool à 90° renfermant 5 pour cent de son volume d'acide chlorhydrique officinal. Porter au B.M. bouillant pendant une minute.

On peut obtenir :

1°) un liquide incolore: réaction négative.

2°) un liquide vert, bleu ou rouge violacé: réaction positive.

3°) un liquide brunâtre: ajouter II gouttes d'eau oxygénée officinale diluée au 1/10° et porter de nouveau au B.M. bouillant pendant une minute. Si le liquide devient vert la réaction est positive.

METHODE DE NAU (16)

Principe - La bilirubine est libérée de ses combinaisons par l'acide trichloracétique, puis oxydée par la chloramine en biliverdine, qui est caractérisée par la teinte qu'elle communique à l'alcool amylique.

Technique - Dans un gros tube à essais, mélanger :

(urine ..... 10 à 20 cm3
) acide trichloracétique à 20
(pour cent ..... 5 à 10 cm3
) chloramine à 1 pour cent... 1 cm3
(alcool amylique ..... 2 à 3 cm3

Agiter vivement et laisser reposer. Après quelques minutes, l'alcool amylique surnageant présente une teinte verte plus ou moins foncée dans le cas d'urines ictériques.

METHODE DE KUHN (17)

Principe - Après oxydation à l'état de biliverdine par le sulfate de cuivre ammoniacal, la bilirubine est libérée de ses combinaisons alcaline ou cuprique par l'acide phosphorique. La biliverdine est dissoute dans de l'alcool qui se colore en vert.

Technique - Dans un tube à essais, mélanger :

(urine..... 20 cm3
) sulfate de cuivre ammoniacal. 2 cm3

(sulfate de cuivre à
) 5 pour cent..... 20 cm3
(ammoniaque officinale..... 10 cm3

L'oxydation des pigments biliaires est immédiate. On libère ensuite la biliverdine par addition de :

acide orthophosphorique à 60°B au 1/2: 2 cm3.

Mélanger, ajouter V gouttes de toluène et agiter vivement.

Laisser reposer, puis, lorsque les particules insolubles se sont réunies en surface, faire arriver lentement 3 à 4 cm3 d'alcool à 95°, dans lequel, par une légère rotation du tube, la bilirubine se dissout en donnant une teinte verte.

ETUDE CRITIQUE.

Pour entreprendre une étude comparative de ces trois techniques, nous avons dû apporter quelques modifications à celle de NAU (inspirée d'ailleurs d'une méthode de LACHAUX) (18). En effet, après quelques expériences effectuées sur des urines normales addi-

tionnées de bilirubine (environ 2 mg. pour 100 cc), il est apparu que l'oxydation du pigment était incomplète avec la solution de chloramine à 1 p.100. Le titre de cette dernière était en effet un peu plus faible que celui demandé par le Codex (22 p.100 au lieu de 24 à 26 p.100). En utilisant une quantité de cette solution double de celle qui était prescrite, nous avons obtenu, avec des échantillons d'urine préparés comme il est dit plus haut, des colorations vertes tout à fait comparables à celles données par la méthode de KUHN dans les mêmes conditions. Cependant, pour des taux en bilirubine inférieurs à 2 mg. p.100, les réactions de KUHN sont toujours les plus intenses.

D'autre part, si on utilise l'alcool amylique pour l'extraction de la bilirubine, on obtient, après agitation, des émulsions stables dont rien ne se sépare, contrairement à ce que NAU a remarqué. Nous avons remédié à cet inconvénient en soumettant la totalité du liquide à une courte centrifugation: l'alcool amylique se sépare très facilement et on peut lire la réaction.

Enfin, non seulement cette technique est inutilisable sur des urines contenant plus de 0 gr.20 d'albumine par litre (NAU), mais elle est peu sensible: la réaction est en effet négative dès que l'urine contient moins de 0 mg.50 de bilirubine pour 100 cc.

En ce qui concerne la méthode de KUHN, nous l'avons utilisée telle que son auteur l'a décrite, et elle nous a toujours donné entière satisfaction. Nous avons déterminé les limites de sa sensibilité en même temps que celles de la réaction de GRIMBERT sur des urines normales additionnées de quantités variables de bilirubine HOFFMANN-LA ROCHE. Ces urines, conservées sous toluène à la glacière (la réaction apprécie en effet la totalité du pigment, oxydé ou non), ont été examinées après des temps variables. Nous avons ainsi constaté que, à prises d'essai égales, les techniques de KUHN et de GRIMBERT avaient, dans ces conditions, des limites de sensibilité équivalentes, soit 0 mg.25 pour 100 cc.

En passant, nous rappellerons quelques remarques formulées par KUHN, présentant un intérêt pratique :

1°) le sulfate de cuivre ammoniacal se conserve-rait mal. Pour éviter toute altération, il serait alors préférable de le préparer extemporanément. Pour notre part, nous avons utilisé le même réactif pendant plusieurs mois sans observer la moindre altération, et la sensibilité de la réaction ne fut pas diminuée en quoi que ce soit.

2°) Aucun corps étranger (albumine, glucose, robiline), quelle que soit sa concentration dans l'urine, ne gêne la réaction. Cependant, en cas de colorations accessoires, KUHN préconise l'emploi (auquel nous n'avons jamais eu à recourir) d'alcool additionné de deux pour cent de formol (à 40 p.100) au lieu d'alcool à 95°.

Résultats obtenus

Nous avons pratiqué les deux techniques de GRIMBERT et de KUHN sur un grand nombre d'échantillons d'urine et nous avons constaté qu'elles avaient toutes deux la même sensibilité. Cependant la technique de KUHN paraît avantageuse, du fait qu'elle nous a permis de préciser d'une manière très nette certains résultats où la réaction de GRIMBERT était douteuse.

Dans deux cas particuliers, nous avons exécuté les trois réactions envisagées et nous avons tenté d'apprécier la bilirubine au moyen d'une technique légèrement différente de celle qui est exposée au chapitre suivant : "Bilirubine dans l'urine".

Voici la technique utilisée :

Précipitation de la bilirubine de l'urine au moyen de chlorure de baryum à 10 p.100. Reprise du précipité par de petites quantités de potasse alcoolique N/100 jusqu'à épuisement total, en opérant chaque fois, après trituration, au B.M. à 60° pendant 5 minutes. De l'extrait obtenu (complété au besoin à 10 cc avec la potasse N/100), 2 cc sont utilisés pour faire une diazoréaction avec 0 cc.20 du réactif décrit dans la technique de WITH.

Les teintes obtenues après 30 minutes sont appréciées par comparaison avec l'extrait sans réactif,

au photomètre de MEUNIER (avec cuves de 10 mm. écran bleu et diaphragme 5). Pour chaque cas, n est donné en graduations du tambour sachant que, dans les mêmes conditions, une solution de bilirubine à 0 mg.50 dans 100 cc de potasse alcoolique N/100 donne n = 94.

1ère urine: M.....
Recherche : GRIMBERT + +
KUHN + +
Dosage n = 83 à partir de 5 cc d'urine
soit 0 mg.88 p.100

2ème urine: M'.....
Recherche : GRIMBERT + + +
KUHN + + + + +
NAU + + + + +
Dosage n = 94 à partir de 2 cc d'urine
soit 2 mg.50 p.100

CONCLUSIONS - Cette étude nous a permis de comparer à la technique de GRIMBERT deux techniques plus récentes, d'exécution facile et rapide. Si la méthode de NAU a dû être écartée en raison d'une réalisation imparfaite et d'une sensibilité un peu trop faible, celle de KUHN paraît devoir être retenue. En effet elle jouit de 2 avantages: rapidité et extrême facilité d'exécution, conformes aux buts que nous nous sommes proposés. Enfin sa spécificité et sa sensibilité en font une technique de laboratoire fidèle et sûre, digne du plus grand intérêt.

BIBLIOGRAPHIE

14 - BALATRE (P.) - J. Pharm. Chim. 1935-(8)-22-166

1-15 - GRIMBERT (L.) - J. Pharm. Chim. 1905-(6)-22-487

3 - HAMMARSTEN (O.) - Skand. Arch. Physiol. 1899-9-313

88 - HAWKINSON (V.), WATSON (C.J.) et TURNER (R.H.)- J. Amer. Med. Assoc. 1945-129-514

2 - JOLLES (A.) - Z. physiol. Chem. 1893-18-545

17 - KUHN (C.) - J. Pharm. Chim. 1928-(8)-8-546

5-18 - LACHAUX (M.) - Thèse Doct. Univ. (Pharm.) Paris 1938

6 - MAHER (F.T.) - Science 1941-94-398

9 - MARSH (F.) - Nature 1940-145-782

7 - MINIACI (F.) - Rev. Asoc. bioquim. Argentina 1942-8-27; d'après Ch. Abst. 1944-38-(3)-6315

13 - MYERS (C.P.) - J. Ind. Hyg. Toxicol. 1945-27-52

16 - NAU (A.) - Bull. Soc. Pharm. Bordeaux 1942-80-122

10 - NAUMANN (H.N.) - Biochem. J. 1936-30-762

12 - RUBINO (M.C.) et VOJEDOVSKY (N.) - Anales Asoc. Quim. Farm. Uruguay 1942-45-25 ; d'après Ch. Abst. 1943-37-(1)-1731.

4 - SALKOWSKI (E.) - d'après J. Pharm. Chim. 1905-(6)-22-487.

11 - YUDKIN (J.) - Brit. med. J. 1945-n°4395-445

II - DOSAGE DE LA BILIRUBINE DANS L'URINE.

La recherche seule des pigments biliaires dans l'urine peut n'être pas suffisante dans les cas où on veut apprécier l'intensité de l'élimination de la bilirubine, ou suivre la courbe de cette élimination. En effet, s'il est facile d'apprécier l'intensité de la réaction de faiblement à fortement positif, on est vite limité dans ce dernier cas par l'identité des réactions obtenues. Il est alors nécessaire de recourir à un dosage des pigments biliaires si on veut connaître d'une manière plus précise l'intensité de leur élimination.

Nous avons pu relever un certain nombre de techniques: la plupart ne sont que des modifications en vue d'une appréciation quantitative, des techniques que nous avons énumérées au chapitre précédent. Celles qui opèrent par oxydation utilisent la méthode de l'anneau-limite et ne donnent que des résultats très approximatifs. Celles qui emploient la diazoréaction sont plus sensibles, mais opèrent selon un processus particulier que nous étudierons ici.

Le dosage de la bilirubine dans l'urine présente quelques difficultés, dûes en particulier à la faible teneur du produit à doser et à sa très grande altérabilité. En effet ce dosage par diazoréaction ne s'applique qu'à la portion "bilirubine" des pigments biliaires. La biliverdine s'en trouve donc exclue et aucun procédé, à l'heure actuelle, ne permet d'opérer la réduction de cette biliverdine en bilirubine. On sait d'autre part que celle-ci peut se détruire pendant une simple exposition à l'air de l'urine à analyser, de 25 à 30 p.100 environ en quelques heures (WITH 1). Pour conserver à ce dosage toute sa valeur, il conviendra d'opérer aussi rapidement que possible sur l'urine récemment émise, à moins qu'on utilise un procédé permettant de "stabiliser" la bilirubine pendant un certain temps. Dans ce but, BARAC(2) a employé l'acide ascorbique en milieu alcalin; la stabilisation dure alors un temps assez long : environ 72 h. (LAMBRECHTS et BARAC 3). Dans ces condi-

tions, le dosage peut être fait dans un laps de temps moins rigoureux qu'en l'absence de stabilisant. Rappelons enfin que la portion biliverdine, comme nous l'avons signalé, n'est pas dosée par cette méthode, même lorsqu'elle se trouve à l'état normal au moment de l'émission, comme c'est le cas pour certaines urines ictériques.

L'ensemble des méthodes par diazoréaction, auxquelles il faut toujours appliquer les restrictions ci-dessus, s'exécute en deux phases qu'on peut facilement distinguer: 1°) séparation de la bilirubine par précipitation, suivie ou non d'une extraction; 2°) diazoréaction proprement dite. Cette dernière exige de nombreuses précautions et, les auteurs la pratiquant selon des techniques assez diverses, nous étudierons d'abord les différentes phases de cette réaction avant d'entreprendre la mise au point de l'extraction proprement dite. Nous exposerons ensuite 3 techniques parmi les plus intéressantes, et nous en étudierons plus loin les diverses phases (voir page 40).

ETUDE DE LA DIAZORÉACTION

Cette réaction s'opère avec l'acide diazobenzène sulfonique (réactif d'EHRLICH), qui fournit avec la bilirubine un produit de copulation de coloration rouge violacée intense. Cette réaction est beaucoup plus sensible que le procédé par oxydation. Cependant des critiques ont été formulées par plusieurs auteurs: d'une part toute la bilirubine ne se transformerait pas en son diazodérivé; d'autre part elle s'oxyderait partiellement en biliverdine pendant le temps de la réaction. Nous avons pourtant retenu cette méthode qui peut constituer une technique suffisante de dosage de la bilirubine.

Nous envisagerons successivement au cours de cette étude : 1°) la préparation des solutions de bilirubine; 2°) les différentes formules de diazoréactifs proposées par plusieurs auteurs; 3°) les conditions les plus favorables au meilleur développement de la réaction.

I - Préparation des solutions de bilirubine.

Ces solutions ont été préparées à partir de bilirubine HOFFMANN - LA ROCHE. Etant donné la très grande altérabilité de celle-ci, nous avons, suivant l'avis de BARAC (4), cherché à améliorer la conservation de ces solutions par addition d'acide ascorbique en milieu alcalin dans la proportion de 7,5 mg pour 100 cc.

Nous avons ainsi préparé des solutions aqueuses, alcalines (V gouttes de soude N pour 10 cc) et concentrées de bilirubine (1 mg. pour 10 cc.). Pour l'usage, nous avons dilué cette solution au 1/10e au moyen de potasse alcoolique N/100.

D'autre part, nous avons aussi utilisé des solutions de bilirubine à 1 mg dans 100 cc de potasse alcoolique N/100 que nous avons préparées extemporanément.

II - Utilisation de divers réactifs.

La composition des réactifs utilisés pour la diazoréaction et leur mode d'emploi sont parfois assez différents. Nous avons ainsi relevé dans les trois méthodes de SCOTT (5), de WITH (6) et de LAEMMER et BECK (7), que nous avons étudiées ici, les formules suivantes :

A-

	SCOTT	LAEMMER	WITH
Acide Sulfanilique	1 gr	1 gr	5 gr
Acide Chlorhydrique N	150cc	-	-
- - concentré	-	15cc	15cc
Eau distillée qs.pour	1000cc	1000cc	1000cc

B- Nitrite de Sodium à 0,50 p.100 dans les trois cas.

Les diazoréactions de réactifs se préparent extemporanément en mélangeant 10 cc de solution A avec 0 cc 30 (SCOTT et LAEMMER) ou 0 cc 25 (WITH) de solution B.

Ils sont ensuite utilisés suivant des modalités assez diverses : 1°) soit par trituration avec un précipité contenant la bilirubine; 2°) soit par mélange avec un extrait alcoolique et alcalin obtenu à partir de ce précipité.

Enfin les temps de développement de la réaction colorée sont extrêmement variables avec les auteurs :

- 1 à 2 minutes pour SCOTT.

- 2 à 4 heures selon la température pour LAEMMER et BECK.

- 10 minutes pour WITH, qui introduit ensuite un excès d'acide chlorhydrique: ceci a pour effet de faire virer au bleu la teinte rouge violacée de la réaction primitive.

Finalement les colorations obtenues sont appréciées colorimétriquement (SCOTT) ou photométriquement (au moyen des appareils de VERNES: LAEMMER et BECK; ou de PULFRICH: WITH).

III - Conditions de la diazoréaction.

L'étude photométrique de cette réaction nous a permis d'envisager successivement les influences sur le développement de la coloration:

a- de la composition du diazoréactif.

b- de l'addition d'acide chlorhydrique à la fin de la réaction.

c- de la concentration alcoolique du milieu réactionnel.

d- de la durée de la réaction.

Après avoir vérifié avec les données précédentes la stabilisation des solutions de bilirubine par l'acide ascorbique, nous examinerons la valeur de l'appréciation colorimétrique de la diazoréaction selon la technique de SCOTT.

1°) Etude photométrique de la diazoréaction.

Nous avons fait cette étude au moyen de l'électrophotomètre de MEUNIER avec des cuves de 10 mm. d'épaisseur.

L'ensemble des réactions que nous avons effectuées nous conduit à opérer de deux manières différentes:

1 - la première, que nous dénommerons position (B), en utilisant l'écran bleu, le diaphragme étant fermé au zéro, pour les cas où la diazoréaction nous donne une coloration rouge violacée.

2 - la seconde, que nous dénommerons position (V), en utilisant l'écran vert, le diaphragme étant ouvert à 5, pour les cas où en présence d'un excès d'acide chlorhydrique (WITH), la coloration à apprécier est bleu violette. Dans tous les cas, les chiffres donnés sont exprimés en graduations du tambour. Ils sont obtenus en comparant la coloration de la diazoréaction et celle de la solution à examiner ne contenant pas de réactif.

Dans ces conditions, nous avons étudié les différentes phases de ces réactions complexes.

a - Influence de la composition du diazoréactif.

Nous avons comparé les réactifs de LAEMMER et BECK et celui de WITH en opérant sur une solution de bilirubine à 2 mg. pour 100 cc. de potasse N/100 dans l'alcool absolu.

Nous avons mélangé successivement et dans l'ordre :

- 2 cc de solution de bilirubine.
- 0 cc 20 de réactif.
- 0 cc 20 d'acide chlorhydrique au 1/3 (en volume: utilisé dans la technique de LAEMMER et BECK).

La réaction s'étant développée à l'obscurité pendant 10 minutes, la lecture en position (V) a donné:

Réactif de LAEMMER = 165

Réactif de WITH = 186

Après un même temps de diazotation, la coloration la plus intense est obtenue avec le réactif ayant la concentration la plus élevée en acide sulfanilique.

b - Influence de l'addition d'acide chlorhydrique.

Nous avons également constaté que l'acide chlorhydrique au 1/3, que nous avons ajouté dans la réaction précédente, jouait un rôle prépondérant. En effet, non seulement il provoque un virage de la coloration obtenue, mais, lorsqu'il est ajouté au bout d'un certain temps, il a la propriété de bloquer le développement de la réaction.

Nous avons ainsi effectué avec une solution de bilirubine à 1 mg p.100, 2 réactions simultanées :

1°- Solution..... 2 cc.
Réactif de WITH..... 0 cc.20
Acide chlorhydrique au 1/3..... 0 cc.20

2°- Solution..... 2 cc.
Réactif de WITH..... 0 cc.20

Après 10 minutes de réaction à l'obscurité, on ajoute 0,20 cc. d'acide chlorhydrique dans la réaction 2° et la première lecture est faite immédiatement. Voici les résultats en position (V) :

	Addition d'acide chlorhydrique	
	immédiatement	après 10 min.
Lecture après .... 10 minutes	107	116
Lecture après 4 h.40	140	122

Comme nous avons pu le vérifier d'autre part pour la méthode de SCOTT, un temps très long semble favoriser un développement plus intense de la

coloration due à la diazoréaction. La technique rapide, qui opère en 10 minutes, permet cependant d'obtenir d'emblée un résultat stable et élevé. C'est pourquoi nous l'avons retenue et nous verrons plus loin les conditions optima de cette réaction.

Nous avons constaté, d'autre part, que, dans la réaction précédente, une dose trop forte d'acide chlorhydrique joue un rôle inhibiteur: le réactif de WITH, additionné de 10 fois plus d'acide (150 cc. au lieu de 15 cc.) et comparé au réactif normal, donne en position V, avec une solution à 0 mg 5 °/. et après 15 minutes de réaction, les chiffres suivants :

Réactif normal = 99
Réactif + ClH = 89

c - Influence de la concentration alcoolique du milieu sur le développement de la coloration.

Nous avons utilisé une solution concentrée de bilirubine à 1 mg pour 10 cc, préparée comme en 1°.

Une première portion a été diluée au 1/10e au moyen de potasse alcoolique N/100 préparée avec de l'alcool absolu ; une 2e portion a été diluée de même avec de la potasse N/100 préparée cette fois avec de l'alcool à 90°.

2 cc de chacune de ces solutions ont alors été additionnés de 0 cc 20 de réactif de WITH préparé extemporanément. Nous avons mesuré l'intensité des colorations rouge violacées obtenues en position B et voici les chiffres obtenus :

	Alcool absolu	Alcool à 90°
Après 10 min. de réaction à l'obscurité.....	93	83
Après 10 min. de réaction...	89	79
Après 20 min. de réaction...	93	81

La coloration la plus intense est obtenue lorsque le degré alcoolique du milieu réactionnel est aussi élevé que possible.

d - Influence du temps sur le développement de la diazoréaction.

Nous avons opéré avec 2 cc d'une solution de bilirubine à 0 mg 5 p.100, additionnés de 0 cc 20 de réactif de WITH préparé extemporanément, puis abandonnés à l'obscurité pendant 15 minutes dans le premier cas et 30 minutes dans le second.

A ce moment, nous ajoutions 0 cc.20 d'acide chlorhydrique au 1/3 et nous faisions une lecture immédiate en position (V). Un quart d'heure après, une deuxième lecture nous a permis de vérifier le blocage de la réaction :

1er cas	1	2	3	4	2e cas	1	2	3	4
Durée:(15 min.)					(30min.)				
1ère lecture immédiate	95	97	100	98		96	98	100	101
2ème lecture 1/4 h. après	95	97	105	101		97	99	102	102

La lecture de ces résultats montre que, dans ces conditions, il est suffisant de laisser la réaction se développer au maximum 15 minutes (nous avons vu que WITH préconise 10 minutes).

De plus nous avons constaté, au cours d'essais effectués sur une solution de bilirubine à 0 mg. 5 p.100, que la lumière a une action inhibitrice très faible puisque nous avons enregistré une diminution de l'intensité de la coloration (se traduisant par une diminution maxima des lectures photométriques de 6 p.100).

Nous noterons, pour terminer, l'influence de l'acide ascorbique sur la conservation de quelques solutions de bilirubine, que nous avons pu observer nous-même.

Conservation des solutions de bilirubine.

1 - Dans le premier cas, nous avons comparé une

solution stabilisée et une autre non stabilisée par l'acide ascorbique. Ces solutions à 0 mg 5 p.100 de bilirubine contenaient 7 mg 5 p.100 d'acide ascorbique.

Nous avons mélangé 2 cc de chacune de ces solutions avec 0 cc 20 de réactif extemporané de WITH et nous avons abandonné chaque mélange à l'obscurité pendant 10 minutes.

Nous avons fait les lectures en position (B) lorsque la réaction était faite immédiatement après la préparation des solutions : 92 et 93 (sol. stabilisée).

Après des temps variables de conservation des solutions à la glacière, nous avons fait une nouvelle lecture de la réaction obtenue dans les mêmes conditions. Nous avons alors observé que la solution stabilisée ne s'altérait que lentement puisque nous trouvions encore 83 après 6 jours de conservation. Par contre, l'autre solution non stabilisée s'altérait beaucoup plus rapidement de sorte que la lecture ne donnait que 75 après les 24 premières heures de conservation.

Ces quelques chiffres permettent de se rendre compte de l'action stabilisante de l'acide ascorbique.

2 - Dans le second cas, nous avons simplement observé une solution de bilirubine à 1 mg p.100 dans la potasse N/100 dans l'alcool absolu.

Après des temps variables de conservation à la glacière, nous avons employé cette solution pour faire des diazoréactions (2 cc. solution + 0,20 cc. réactif de WITH extemporané) que nous avons laissées se développer pendant 10, 20 et 30 minutes.

Voici les chiffres obtenus par la lecture en position B du photomètre :

Temps de conservation	Diazoréaction (temps en minutes) 10	20	30
10 minutes.....	111	117	119
25 minutes.....	118	125	128
1 heure.....	117	118	121
17 heures 30 minutes.	106	109	112

Dans ces conditions, il semble que la solution de bilirubine puisse être utilement employée dans la première heure, avec un optimum au bout de 30 minutes. Ensuite elle s'altère lentement ainsi que le montrent les résultats après 17 heures de conservation. Ici, contrairement au tableau du paragraphe C où la réaction est bloquée par l'acide chlorhydrique, la réaction continue de se développer au-delà de 15 ou 20 minutes comme en b, tout en tendant vers un maximum que nous n'avons pu fixer faute d'expérimentation suffisante.

Nous rappellerons maintenant dans quelles conditions s'effectue pratiquement l'appréciation des résultats pour les deux méthodes de WITH et de LAEMMER et BECK qui utilisent la photométrie. Le premier opère sur une suspension alcoolique du précipité contenant la bilirubine et il élimine ultérieurement celui-ci par centrifugation. Les seconds font une extraction du précipité au moyen de la potasse alcoolique N/100 à chaud et opèrent la diazoréaction sur une partie aliquote de l'extractum. Les chiffres obtenus au photomètre sont traduits en mg p.100 de bilirubine, soit à l'aide d'une formule (WITH), soit à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue avec des solutions pures de bilirubine (LAEMMER et BECK), identiques à celles que nous avons préparées pour l'étude de la diazoréaction.

2°) Etude colorimétrique de la diazoréaction.

Nous envisageons spécialement ici la méthode de SCOTT. Celle-ci, en effet, ne nécessite plus la préparation ou la conservation de solutions de bilirubine. Les colorations obtenues par diazoréaction sont comparées à une solution éthérée de thiocyanate ferrique dont SCOTT donne ainsi la formule :

a - Alun de fer ammoniacal (à 24 OH_2) 0 gr.151
Acide chlorhydrique concentré 50 cc
Eau distillée q.s.pour 100 cc

b - Solution (a) 10 cc
Acide chlorhydrique concentré 25 cc
Eau distillée q.s.pour 250 cc

c - Thiocyanate de potassium à 20 °/..

Mélanger vivement en flacon bouché :

Solution (b) 3 cc
Solution (c) 3 cc
Ether 12 cc

L'extrait éthéré correspond ainsi à une concentration de 0 mg 5 p.100 en bilirubine. L'utilisation d'un tel témoin est certes beaucoup plus commode que celle de solutions pures de bilirubine. Sa préparation est très facile, les solutions séparées (a), (b) ou (c) étant d'une bonne conservation.

Malheureusement, nous avons dû lui reconnaître à l'usage quelques inconvénients :

1°) Dans le cas d'urines contenant moins de 5 mg p.100 de bilirubine, on se trouve dans l'obligation de diluer la solution étalon afin de pouvoir comparer les teintes obtenues. L'emploi d'éther comme diluant (qu'il s'agisse d'éther ordinaire, d'éther lavé à l'eau et conservé sur de la soude, ou encore d'éther obtenu par extraction de la même manière que l'étalon, à partir de solutions seulement acides) entraîne dans tous les cas un virage de la teinte de l'étalon vers le jaune qui rend alors impossible toute comparaison avec la diazoréaction qui est toujours rose violacée.

2°) Les mesures par colorimétrie sont parfois assez longues, surtout lorsque l'opérateur n'est pas bien exercé. Il arrive alors que, si on opère à une température ambiante assez élevée, l'éther de la solution étalon s'évapore spontanément et celle-ci a tendance, de ce fait, à se concentrer.

3°) Enfin nous ne croyons pas sans intérêt de signaler, dans un but pratique, qu'il faut éviter

d'opérer avec des cuves ordinaires pour colorimétrie. La solution éthérée attaque en effet les joints résineux de ces dernières : elle se colore très rapidement et devient inutilisable.

Il est donc nécessaire, si on veut employer la solution-témoin de SCOTT, de prendre toutes précautions utiles pour conserver à ce dosage toute sa rigueur scientifique.

Nous résumerons ici les résultats obtenus au cours de l'étude photométrique de la diazoréaction:

1°- il convient d'utiliser le réactif de WITH.

2°- il est préférable d'opérer le blocage de la réaction par addition d'une petite quantité d'acide chlorhydrique au 1/3.

3°- la concentration alcoolique du milieu doit être aussi élevée que possible.

4°- il faut laisser la réaction se développer environ 15 minutes, de préférence à l'obscurité.

ETUDE DE L'EXTRACTION DE LA BILIRUBINE.

Après avoir examiné en détail les conditions de la diazoréaction, nous sommes maintenant en mesure d'appliquer cette dernière à la bilirubine obtenue par extraction à partir de l'urine.

Parmi les procédés les plus employés pour séparer la bilirubine de l'urine, il faut citer :

1°) la précipitation au moyen :

1 - d'acétate de baryum: SCOTT (8).

2 - de chlorure de baryum: LAEMMER et BECK (9), CASTEX et GARCIA (10), de SALAMANCA et ses collaborateurs (11).

3 - d'un mélange de phosphate disodique et de chlorure de calcium: WITH (12), JENDRASSIK et GROF (13).

2°) l'extraction par le chloroforme: KERPPOLA (14), HUNTER (15).

Les trois méthodes, dont nous avons précédemment comparé les diazoréactifs; utilisent chacune un mode de précipitation différent. Nous avons pensé compléter utilement ces notes en donnant ici un exposé succinct de ces techniques, telles qu'elles sont décrites par leurs auteurs.

Technique de SCOTT -

Principe - La bilirubine est précipitée au moyen d'acétate de baryum. Après lavage, le précipité est trituré avec de l'alcool absolu, puis soumis à l'action du diazoréactif.

Réactif - Solution d'acétate de baryum de pH = 6. A 100 cc d'une solution saturée et filtrée d'hydroxyde de baryum, ajouter 4 cc,5 d'acide acétique au 1/2 en volume. Ajuster à pH = 6 au moyen du rouge de bromocrésol par addition, suivant le cas, de petites quantités d'acide acétique ou d'eau de baryte saturée.

Mode opératoir - Opérer sur une prise d'essai de 1 à 5 cc d'urine acidifiée légèrement au tournesol par addition d'acide acétique au 1/10e. Précipiter la bilirubine en ajoutant 10 cc de la solution d'acétate de baryum, en présence de quantités de sulfate de sodium à 6 p.100, variables avec la prise d'essai (0 cc.20 pour 1 cc ; 0 cc.10 pour 2 à 3 cc ; 0 cc.05 pour 5 cc). Centrifuger; décanter; puis laver 2 fois le précipité en le reprenant chaque fois par un mélange de 2 cc d'eau distillée et 8 cc de solution d'acétate de baryum. Finalement, reprendre le précipité par 0 cc 5 d'eau, puis 2 cc d'alcool absolu et 1 cc de diazoréactif. Après 1 ou 2 minutes, purifier le liquide par agitation avec 1 cc. de sulfate d'ammonium à saturation et 2 cc de chloroforme. Séparer et filtrer la couche chloroformique dont la teinte est appréciée colorimétriquement par comparaison avec la solution étalon décrite plus haut.

Technique de T. K. WITH -

Principe - La bilirubine est précipitée au moyen d'un mélange de phosphate disodique et de chlorure de calcium. Le précipité desséché est trituré avec de l'alcool et le tout, additionné de diazoréactif.

Réactifs - 1- Phosphate disodique (à 12 OH_2) à 11 p.100
2- Chlorure de calcium à 20 p.100

Mode opératoire - Additionner la prise d'essai d'urine (1, 2 ou 5 cc) de 1 cc,5 de la solution de phosphate disodique et 0 cc 5 de celle de chlorure de calcium. Centrifuger 10 minutes. Laver ensuite 3 fois avec une solution de chlorure de calcium à 0,20 p.100. Bien égoutter le tube de centrifugation et l'essuyer au papier avant de triturer le précipité avec 5 cc d'alcool à 95° et 1 cc de diazoréactif. Après 10 minutes de réaction, ajouter 2 cc d'acide chlorhydrique concentré. Séparer le précipité par centrifugation. Compléter le volume du liquide à 10 cc avec de l'alcool. Mesurer au photomètre de PULFRICH (écran S 57) et déterminer les mg p.100 de bilirubine par $c = 3,46 \times E_{1\ cm.}$ lorsque la prise d'essai est de 2 cc.

Lorsque l'addition de l'acide chlorhydrique ne fait pas virer la teinte du rouge au bleu, agiter immédiatement avec un volume de chloroforme. Centrifuger. Séparer la couche chloroformique bleue qui sera complétée à 10 cc avec de l'alcool.

Technique de LAEMMER et BECK -

Principe - La bilirubine, précipitée par le chlorure de baryum, est extraite du précipité au moyen de potasse alcoolique. La diazoréaction est alors pratiquée sur l'extractum.

Mode opératoire - Additionner 50 cc d'urine acide de 15 cc de chlorure de baryum à 10 p.100. Centrifuger, Décanter. Laver une fois à l'eau. Egoutter; sécher au papier. Reprendre le précipité par 2 cc de potasse alcoolique N/10 au B.M. à 60° pen-

dant 5 minutes. Centrifuger. Décanter. Epuiser de même par petites quantités de potasse jusqu'à épuisement total et compléter à 10 cc. Pratiquer la diazoréaction :

	Réaction	Témoin
Extrait.....	2 cc	2 cc
Diazoréactif.....	0,20	-
Eau.....	-	0,40
Acide chlorhydrique au 1/3.....	0,20	-

Comparer au photomètre de VERNES après 2 à 4 h. de réaction, suivant la température.

ETUDE CRITIQUE DE CES TECHNIQUES-

La technique de SCOTT séduit par son apparente simplicité. Malheureusement elle ne nous a pas permis d'obtenir de résultats satisfaisants.

En effet, l'acétate de baryum, tel qu'il est préparé, ne suffit pas à précipiter complètement la bilirubine de l'urine. Nous avons suivi exactement la technique de SCOTT pour effectuer un dosage sur une urine connue renfermant 2 mg p.100 de bilirubine et, nous avons constaté que les 9/10 de celle-ci se trouvaient exclus du dosage. Aussi nous avons modifié la composition de la solution d'acétate de baryum en partant de ce sel et en ajustant au pH convenable : les résultats se sont sensiblement améliorés, 50 p.100 seulement du produit n'étant pas dosés. Enfin, connaissant la faveur auprès de nombreux auteurs de la précipitation au moyen du chlorure de baryum à 10 p.100, nous avons utilisé celui-ci. Dans ces conditions, 85 p.100 de la bilirubine mise en jeu étaient réellement dosés. De plus, nous n'avons pas cru devoir retenir la précipitation au phosphate disodique et chlorure de calcium qui nous a paru moins spécifique et moins facile à exécuter.

Nous nous en sommes finalement tenus pour la précipitation quantitative de la bilirubine de l'urine, à l'avis de BARAC (16). Celui-ci signale d'une part qu'il est bon de faire cette précipitation

en présence d'une petite quantité de sulfate de sodium. En effet, avec certaines urines pauvres en sels minéraux, le précipité formé est assez faible pour laisser échapper une partie de la bilirubine. D'autre part, cet auteur a montré la valeur de la précipitation barytique en opérant de la manière suivante : il utilise une solution alcoolique et une solution de bilirubine dans l'urine. Cette dernière est telle qu'après précipitation barytique et extraction au moyen de potasse alcoolique N/100, l'extractum obtenu a la même concentration que la solution alcoolique pure. Dans ces conditions, les mesures photométriques directes des teintes jaunes obtenues sont équivalentes à 2,6 p.100 près.

RESULTATS OBTENUS -

Nous avons déjà exposé quelques résultats pour montrer le rapport qui pouvait exister entre les doses de bilirubine contenues dans l'urine et l'intensité des réactions de recherche des pigments biliaires. Quelques échantillons nous ont permis de trouver des doses de bilirubine allant de 0,90 à 2,5 mg p.100. Ces dosages ayant été effectués au cours de ce travail les techniques employées étaient légèrement différentes de celle que nous avons définitivement admise. Nous avons également étudié un échantillon d'urine particulièrement riche en pigments biliaires. La diazoréaction fut presque nulle, ceci étant dû au fait que la presque totalité de la bilirubine avait été oxydée lors du transport et de la conservation.

Nous donnerons pour terminer une technique de dosage de la bilirubine dans l'urine, qui opère dans les meilleures conditions.

TECHNIQUE PROPOSEE

Précipitation de la bilirubine.

Opérer sur 5 cc. d'urine, additionnés de 0 gr.50 environ de sulfate de sodium. Précipiter la bilirubine par addition de 1 cc.5 de chlorure de baryum à 10 p.100. Centrifuger. Décanter. Laver une fois

le culot de centrifugation à l'eau distillée. Après décantation, bien égoutter le tube et sécher au papier.

Extraction de la bilirubine.

Triturer le culot de centrifugation avec 2 cc. de potasse N/100 dans l'alcool absolu. Porter le tout au B.M. à 60°. Centrifuger. Décanter dans un tube jaugé à 10 cc. Répéter l'opération avec de petites quantités de potasse alcoolique jusqu'à épuisement complet. Amener à 10 cc. le volume d'extractum avec la potasse alcoolique.

Diazoréaction.

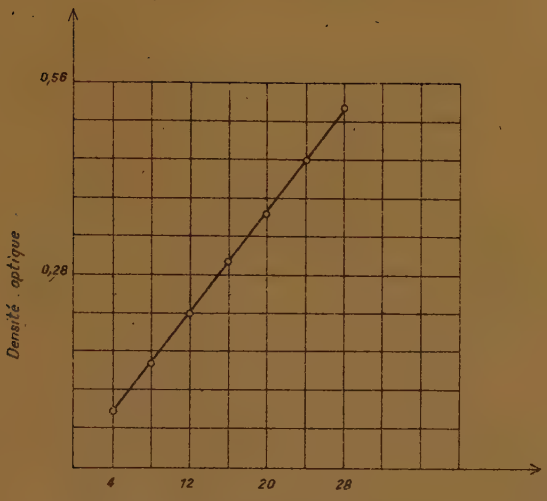
Dans 2 tubes, introduire successivement :

	Réaction	Témoin
Extractum	2cc.	2cc.
Diazoréactif de WITH	Occ.20	---

Laisser la coloration se développer 10 minutes à l'obscurité; puis ajouter :

Acide chlorhydrique au 1/3	Occ.20	------
Eau distillée	------	Occ.40

Comparer les colorations obtenues à l'électrophotomètre de MEUNIER (avec cuve de 10 mm, écran vert, diaphragme 5). Exprimer les résultats en mg. de bilirubine pour 100cc. en se reportant à une courbe d'étalonnage de la forme ci-dessous, obtenue en soumettant à la diazoréaction des solutions alcooliques de bilirubine, et en tenant compte des dilutions.



Courbe obtenue par diazotation d'une solution de bilirubine.

CONCLUSIONS

Nous avons étudié, d'une part, les conditions optima de la diazoréaction sur des solutions de bilirubine; d'autre part, nous avons retenu comme mode d'extraction de la bilirubine la précipitation par le chlorure de baryum. Aucune des 3 méthodes que nous avons étudiées n'ayant donné de résultats entièrement satisfaisants, nous avons exposé à la fin de cette étude une technique assez rapide pour la circonstance Elle s'inspire de toutes les remarques que nous avons pu faire au cours de ce travail et elle permet d'obtenir des résultats suffisants pour apprécier l'intensité de l'élimination urinaire de la bilirubine.

BIBLIOGRAPHIE

2-4- BARAC(G.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1939-21-1163

16- BARAC(G.) - C. R. Soc. Biol. 1943-7-412

10- CASTEX(M.R.) et GARCIA(A.L.) - Rev. Soc. Argentina Biol. 1940-16-271 ; d'après Ch. Abst. 1941-35-(2)-4054

15- HUNTER(G.) - Brit. J. exp. Pathol. 1930-11-407

13- JENDRASSIK(L.) et GROF(P.) - Biochem. Z. 1938-29-71

14- KERPPOLA(W.) - Act. med. Scand. Suppl. 1932-50-277

9-7- LAEMMER(M.) et BECK(J.) - C.R. Soc. Biol. 1933-113-166

3- LAMBRECHTS(A.) et BARAC(G.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1939-21-1171.

11- De SALAMANCA(F.E.), POGGIO(F.) et De La GANDARA(J.O.) - Trab. real. dur. el curso 1943-1944 - II-7 Madrid

5-8- SCOTT(L.D.) - Brit. J. exper. Pathol. 1941-22-17

1-6-12- WITH(T.K.) - Z. physiol. Chem. 1942-275-166

Chapitre III

RECHERCHE DU SANG DANS L'URINE.

La recherche du sang dans l'urine, telle qu'on la pratique actuellement, s'effectue selon des techniques assez diverses pour lesquelles on a recours à des méthodes spectroscopiques, microscopiques ou chimiques. Le but que nous poursuivons étant d'opérer d'une manière aussi rapide que possible, nous n'avons pas retenu les méthodes spectroscopiques, qui sont délicates à employer et nécessitent un appareillage particulier. Quant aux procédés microscopiques et chimiques, ils sont couramment employés dans les cas d'hématurie, les seconds l'étant seulement dans les cas d'hémoglobinurie.

Nous n'avons retenu dans cette étude que les méthodes chimiques, qui reposent sur les propriétés dites "peroxydasiques" du pigment sanguin et de son dérivé: l'hématine. Pour mettre en évidence ces propriétés, on utilise des réactifs incolores qui, en présence d'eau oxygénée, se transforment en dérivés colorés. Pour utiliser de telles techniques, on devra s'entourer de toutes les précautions nécessaires à la spécificité de la réaction.

Parmi les nombreux réactifs utilisés pour mettre en évidence les propriétés "peroxydasiques" du pigment sanguin, on trouve :

1°- la benzidine: SCHUMM (1), WEINBERGER (2), GREEF (3), BOAS (4), LEIBOFF (5), SZANCER (6), INGHAM (7), LARSEN (8), NOSAKA (9).

2°- la phénolphtaléine réduite: KASTLE (10), POZZI-ESCOT (11), TELMON (12), JUSTIN-MUELLER (13), JOHANNESSEN (14).

3°- la teinture de gaiac: SCHROEDER (15), ROTHSCHILD(16) POIROT et LAMBERT (17), STRATTON (18).

4°- le pyramidon: THEVENON et ROLLAND (19), ESCHAICH (20), POIROT et LAMBERT (21).

5°- l'o-toluidine: STONE et BURKE (22), CASOLARI (23).

6°- la leucobase du vert malachite: MICHEL (24).

7°- la rhodamine réduite: FULD (25).

8°- la phénylhydrazine: EDER et LIPPERT (26).

9°- le p. diaminobenzène et la diméthylamine: INDACOCHEA (27).

10°- l'acide gaiaconique: KUH (28).

Tous ces réactifs s'emploient selon deux techniques assez différentes qui opèrent:

1°) sur l'urine directement, selon la méthode de l'anneau-limite. Ce procédé est défectueux. En effet on rencontre dans l'urine de nombreuses substances qui sont susceptibles de réagir dans ces conditions: iodures, bromures, sels de cuivre ou de fer (utilisés pour la désinfection des vases destinés à recueillir les urines). D'autre part des éléments normaux de l'urine (acide urique, pigments) sont inhibiteurs. Il est donc nécessaire d'effectuer une séparation pour éliminer toutes les substances parasites.

2°) sur un extractum obtenu à partir de l'urine à l'aide de solvants divers. Cette technique semble être la plus sûre, mais, dans la plupart des cas, des solvants mal appropriés rendent l'extraction insuffisante.

Nous avons donc retenu les techniques qui opèrent par extraction et, jusqu'ici, c'est celle de POIROT et LAMBERT qui a été le plus fréquemment utilisée. Nous ne croyons pas devoir la reproduire ici: on la trouvera suffisamment détaillée dans les fiches du Pr. FLEURY. Cette technique est facile à exécuter et sa mise au point parfaite a toujours permis d'obtenir des résultats impeccables. Cependant, dans bien des cas, la phase d'extraction est assez longue, du fait qu'on y obtient des émulsions relativement stables. D'autre

part, la nécessité où l'on est de distinguer les cas d'urines albumineuses ou non, et l'emploi d'une technique distincte dans le premier cas rendent la technique assez complexe. Aussi avons-nous pensé qu'il n'était pas sans intérêt de remplacer la phase extractive de la technique de POIROT et LAMBERT par un procédé plus simple. Par contre, nous avons conservé pour la caractérisation les deux réactifs à la teinture de gaiac et au pyramidon, qui ont été mis au point par ces auteurs et qui sont d'une très bonne conservation et d'une préparation facile. Notons en passant que POIROT et LAMBERT ont écarté la phtaléine réduite (KASTLE-MEYER 29), de préparation délicate, menant à des réactions instables et donnant des résultats inconstants. Malgré la faveur traditionnelle dont continue à jouir ce réactif, nous avons suivi l'avis de ces auteurs en renonçant à son emploi.

Parmi les méthodes par extraction que nous avons relevées dans la bibliographie, celle de CASOLARI (30) a paru répondre le mieux à notre but. En effet cet auteur utilise une technique simple d'extraction du pigment sanguin. Il se place uniquement dans le cas d'urines albumineuses et rend telles les urines normales par addition d'albumine. Il précipite alors cette dernière au moyen de tungstate de sodium en milieu acétique. Après une courte centrifugation, le culot albumineux obtenu dans ces conditions renferme tout le pigment sanguin contenu dans la prise d'essai. Ce culot est dissous dans la potasse à 10 p.100, puis on caractérise le pigment dans cette solution: il suffit, après une légère acidification à l'acide acétique, d'ajouter quelques gouttes d'eau oxygénée, puis, en surface, du réactif à la toluidine. A l'usage, cette technique s'est montrée très simple à effectuer et très fidèle. De plus, nous avons cherché à simplifier encore le traitement du précipité d'albumine avant la caractérisation. En effet la solubilisation au moyen de la potasse s'est révélée superflue, puisque l'acidification ultérieure du milieu précipite de nouveau l'albumine. Nous nous sommes rendu compte qu'il était suffisant de triturer le culot de centrifugation avec 3 ou 4 gouttes d'acide acétique cristallisable et de mettre le tout en suspension dans 2 ou 3 cc d'eau distillée avant de pratiquer la réaction finale.

Dans ces conditions, nous avons mis au point et utilisé, pour la recherche du pigment sanguin dans l'urine, une méthode que nous allons exposer maintenant en détail.

METHODE UTILISEE

Réactifs employés.

1 - Solution d'ovalbumine à 10 gr. p.1000 préparée selon la technique de MESTREZAT (31) pour le dosage de l'albumine du liquide céphalo-rachidien par néphélémétrie, et conservée au moyen du formol à 40 p.100 (à raison de une partie de formol pour quarante de la solution albumineuse; on porte le tout à l'étuve à 37° pendant 3 jours).

N.B. Nous avons rejeté, comme source d'albumine, une solution de sérum de même concentration albumineuse. Nous avons désiré obvier à la présence de traces d'hémoglobine qui auraient faussé la réaction de caractérisation.

2 - Solution d'acide acétique au 1/10e.

3 - Réactif précipitant :

Tungstate de sodium.....	6 gr.
Eau distillée.....q.s.pour	100 cc
Acide acétique cristallisable.....	4 cc

4 - Acide acétique cristallisable.

5 - Pour la réaction à la résine de gaiac.

a) Gaiac-pyridine.

Résine de gaiac purifiée.....	10 gr.
Pyridine pure incolore qsp...	100 cc

La dissolution s'effectue très facilement. Conservation illimitée. La résine de gaiac purifiée est obtenue en dissolvant à chaud une partie de résine du commerce dans 5 parties d'alcool à 95°; on filtre le liquide bouillant; la solution est évaporée au B.M. dans une capsule de porcelaine, et le résidu est maintenu à

l'étuve à 100° jusqu'au départ de l'alcool. Le produit fondu est coulé dans des boites en papier sulfurisé où il se solidifie.

b) Alcool-perhydrol.
(Perhydrol..... 0 cc.1(II gouttes)
)Alcool à 95°..... 100 cc

Très bonne conservation.

6 - Pour la réaction au pyramidon.

a) Pyramidon.
b) Alcool-pyridine.
(Pyridine pure incolore... 3 cc
)Alcool à 95°..... 100 cc

Très bonne conservation.

c) Perhydrol (peut être avantageusement remplacé par de l'eau oxygénée à 110 vol.).

Technique

I - Isolement du pigment

Faire 2 opérations identiques en vue des 2 réactions de caractérisation.

10 cc d'urine albumineuse (ou rendue telle par addition de la solution d'albumine à 10 p.1000 contenant 0,50 ou 1 gr. p.1000 environ d'albumine) sont acidifiés au moyen de I à II gouttes d'acide acétique au 1/10e. Le réactif précipitant est ajouté dans la proportion de 1 cc par gr. d'albumine p.1000 jusqu'à fin de précipitation. On centrifuge 3 à 4 minutes et on décante. Le culot de centrifugation est ensuite trituré avec II ou III gouttes d'acide acétique cristallisable, puis le tout est dilué avec 2 ou 3 cc d'eau distillée.

II - Caractérisation du pigment

A - Par la réaction à la résine de Gaiac.

Dans un tube à essai propre, mesurer successivement dans l'ordre et en agitant:

Caiac-pyridine (a)..... 0 cc.1 (II gouttes)
Alcool-perhydrol (b)... 5 cc.

Agiter. Vérifier qu'aucune coloration parasite ne se produit et verser le tout sur l'une des deux suspensions obtenues dans la première phase. Dans le cas de présence de sang, il se développe au bout de 5 minutes une coloration bleue, stable au moins pendant 1 heure.

B - Par la réaction au pyramidon.

Dans un tube à essai propre, introduire dans l'ordre et en agitant :

Pyramidon..... 0 gr.50
Alcool-pyridine (b).... 5 cc
Perhydrol..... 1 cc

puis, après dissolution du pyramidon, verser le tout sur :

Suspension..... 2 cc

Agiter; en présence de sang, coloration bleu-violacée très fugace.

RESULTATS OBTENUS

Après avoir vérifié l'intensité des deux réactions sur 2 cc d'une dilution de III gouttes de sang dans 1000 cm3 d'eau distillée, nous avons appliqué à une dilution de II gouttes dans 5 l. d'eau distillée (POIROT et LAMBERT indiquent comme limite de leur réaction 1 goutte dans 5 litres), la technique que nous venons de décrire après addition, à 10 cc. de dilution, de 0 cc,30 d'une solution d'albumine à 1 p. 1000. Dans ces conditions, les deux réactions ont été intenses.

Nous avons remarqué, en opérant sur cette même dilution, que, si on ne prenait pas soin de triturer le culot de centrifugation avec de l'acide acétique cristallisable, la réaction au pyramidon devenait faible et celle à la résine de gaiac nulle, ce qui prouve la nécessité d'un tel traitement.

Des dilutions à 1 goutte pour 2, 3, 5 ou 10 l. donnent, comme plus haut, des réactions intenses. Enfin, en opérant sur des échantillons d'urine dont nous ignorions la teneur en sang, mais dont certains ne contenaient qu'une goutte de sang pour 5 l, nous avons obtenu de bons résultats par cette technique. Toutefois, pour être indiscutable, la présence du sang devra être confirmée par les deux réactions de caractérisation.

CONCLUSIONS

La méthode de CASOLARI, que nous avons retenue et simplifiée, permet de rechercher d'une manière rapide et facile le sang dans l'urine, quelle que soit d'ailleurs la forme sous laquelle il s'y trouve. Cette technique d'entraînement du pigment par un précipité d'albumine, accompagnée des deux réactions à la teinture de gaiac et au pyramidon, nous paraît présenter des garanties de spécificité, en même temps qu'une facilité et une rapidité suffisantes pour qu'on puisse recommander son emploi en analyse médicale.

BIBLIOGRAPHIE

4- BOAS(Dr.) - Wien. klin. Woch. 1929-42-368

23-30- CASOLARI(A.) - Biochim. Terap. sper. 1932-19-213

26- EDER(R.) et LIPPERT(C.V.) - Schweiz. med. Woch. 1942-72-1245

20- ESCHAICH(A.) - C. R. Soc. Biol. 1919-82-741

25- FULD(E.) - Pharm. Zentr. 1917-58-467

3- GREEF(J.H.) - Med. Klin. 1910-6-1785

27- INDACOCHEA Z. - Prim. Congr. Peruano Quim. (Actas y trab.) 1938-2-729

7- INGHAM(J.) - Biochem. J. 1932-26-1124

14- JOHANNESSEN(A.) - Ugesk. Laeg. 1921-83-1613

13- JUSTIN-MUELLER(E.) - J. Pharm. Chim. 1917-(7)-16-20

10-29- KASTLE(J.H.) - J. biol. Chem. Proceedings 1907-3-xii

28- KUH(O.) - Pharm. Zentr. 1916-57-331

8- LARSEN(K.H.) - J. Lab. clin. Med. 1937-22-935

5- LEIBOFF(S.L.)- J. Lab. clin. Med. 1929-14-1187

31- MESTREZAT(W.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1924-6-694

24- MICHEL(F.) - Chem. Ztg. 1912-36-994

9- NOSAKA(K.) - Mikrochim. Act. 1937-1-78

17-21- POIROT(G.) et LAMBERT(A.) - J. Pharm. Chim. 1926-(8)-4-337

11- POZZI-ESCOT(E.) - Bull. Soc. Chim. Belgique 1908-22-415

16- ROTHSCHILD(J.) - Berlin. klin. Woch. 1908-45-883

1- SCHUMM(O.) - Pharm. Ztg. 1907-52-604

15- SHROEDER(K.)- Berlin. klin. Woch. 1907-44-1379

22- STONE(W.J.) et BURKE(G.T.) - J. Amer. Med. Assoc. 1934-102-1549

18- STRATTON(R.J.) - Pharm. J. 1934-133-769

6- SZANCER- Wiad. Farm. 1930-57-45

12- TELMON(H.) - C. R. Soc. Biol. 1910-69-49

19- THEVENON et ROLLAND - J. Pharm. Chim. 1917-(7)-16-18

2- WEINBERGER(Dr.)- Munch. med. Woch. 1908-55-2538

Chapitre IV

RECHERCHE ET DOSAGE DE L'ALBUMINE DANS L'URINE

La recherche et le dosage de l'albumine urinaire ont déjà fait l'objet de très nombreux travaux. L'étude de ceux-ci montre que, malgré les apparences, on se trouve en face d'un problème d'une assez grande complexité. C'est pourquoi nous avons envisagé de l'étudier sous ses deux aspects: d'une part la recherche; d'autre part le dosage.

La recherche de l'albumine urinaire en quantités assez importantes (plus de 0 gr.50 par litre) ne pose pas de difficultés et on trouve de nombreuses méthodes qui permettent de résoudre facilement ce problème. Par contre, il n'en est plus de même lorsqu'il s'agit de petites doses d'albumine (ce qu'on appelle généralement des "traces d'albumine") et que, par surcroît, leur recherche doit s'effectuer, comme le cas se présente assez fréquemment, dans des urines troubles impossibles à clarifier par simple filtration. Jusqu'ici de nombreux réactifs plus ou moins spécifiques ont été utilisés pour mettre en évidence la présence de l'albumine dans l'urine; nous avons pu relever notamment :

1°) l'acide nitrique (dont l'emploi fut signalé la première fois en 1852 par l'autrichien HELLER) : SACHS (1), DROSTE (2), ZOTIER (3); ou l'acide nitrique en présence de sels: nitrate de sodium: LINDBERGER (4); nitrate d'ammonium: MICHEL (5); chlorure de sodium: AUFRECHT (6), BANFI (7).

2°) l'acide sulfosalicylique: KUHL (8), LASH et REITSTOETTER (9), FLEISHMANN (10), LENZ (11), ELMER(12), MAYER (13), ROEPKE (14), SAGASTUME et GHERZI (15); ou le sulfosalicylate de sodium: BUDDE (16).

3°) l'acide acétique à chaud: GLAESGEN (17); ou l'acide acétique en présence de sulfate de magnésium:

RENAUX (18), CAVAZANNI (19); ou de chlorure de sodium: MAYER (20).

4°) l'acide trichloracétique: FLORENCE (21).

5°) le phosphomolybdate d'ammonium, en présence d'acide acétique: BALLONI (22); ou d'acide tartrique: CORZO (23).

6°) l'acide phosphotungstique en présence d'acide chlorhydrique: SUEYOSHI (24).

7°) le chlorure mercurique en présence de chlorure de sodium et d'acide citrique: MAYER (25), JOLLES (26), MINIACI (27).

8°) une solution des acides picrique et citrique sans: SCHMIZ (28), ERDMANN (29); ou avec sulfate de magnésium: STEWART (30).

9°) le phénol: SIEBERS (31), CLAPP et COHEN (32); ou le résorcinol: EDELMANN (33), LIEBERS (34).

10°) l'iodomercurate de potassium en milieu acétique (réactif de TANRET): TANRET (35), MOUNIER (36), de AGUIAR (37).

11°) le nitrate mercurique nitreux (réactif de MILLON): FLORENCE (38), FLEURY et DELAUNEY (39).

12°) le ferrocyanure de potassium seul: DROSTE(40); ou en présence d'acide citrique: ZOICHE (41).

13°) l'iodure de potassium en milieu acétique: MORIKAWA (42).

14°) l'éthyltétrabromophénolphtaléine: FEIGL et ANGER (43).

15°) le p.nitrobenzaldéhyde: STEENSMA (44).

Le dosage de l'albumine urinaire se heurte souvent aux mêmes difficultés que la recherche. En effet le premier n'est parfois qu'une adaptation du second dans un but quantitatif. Pour les fortes doses,

la technique la plus spécifique est celle qui opère par pesée du coagulum obtenu à l'ébullition dans des conditions d'acidité et de salinité convenables. Cependant cette méthode est longue à exécuter, surtout lorsque, dans le cas de doses moyennement élevées d'albumine, on se voit dans l'obligation d'opérer sur une prise d'essai assez importante. D'autre part ce procédé est inapplicable aux faibles doses et il faut alors recourir à des techniques mieux adaptées: néphélémétrie qui peut donner des résultats satisfaisants à partir d'urines convenablement clarifiées, ou encore méthode de l'anneau-limite qui est bien souvent incertaine et imprécise. Quoiqu'il en soit, comme dans le cas de la recherche, les réactifs utilisés pour précipiter l'albumine sont nombreux. On trouve ainsi :

1°) l'acide sulfosalicylique: SARTORY et MEYER(45), FOLIN et DENIS (46); ou le même acide additionné de sulfate d'ammonium et de phénol: SAGASTUME et GHERZI (47); ou de sulfate de sodium et de bleu de phénol: EXTON (48).

2°) l'acide acétique au B.M. : FOLIN et DENIS(49), additionné de chlorure de sodium et de formol: JOLLES (50).

3°) l'acide trichloracétique: FLORENCE (51), GERARD (52), QUICK (53), ANGIOLANI (54), BERGLUND et de SCRIVER (55); additionné de chlorure de sodium: TAMAYO (56).

4°) l'acide phosphomolybdique en présence d'acide sulfurique et de kaolin: LILIENDAHL-PETERSEN (57).

5°) l'acide phosphotungstique additionné d'acide chlorhydrique et d'alcool: TSUCHIYA (58), MATTICE (59), GOODMANN et STERN (60).

6°) le chlorure mercurique additionné d'acide chlorhydrique et de bromure de potassium: SUEYOSHI(61).

7°) l'acide picrique et l'acide citrique (réactif d'ESBACH): DUPUY (62), URBAN (63), SEILER (64), LENK (65), JONES (66); additionnés d'acide trichloracétique: DHOMMEE (67), JOUVENET (68); ou de sulfate de zinc et de chlorure de sodium: STRZYZOWSKI (69).

8°) l'iodomercurate de potassium en milieu acétique: VALLERY (70).

9°) le phénol en présence d'acide citrique et d'alcool: PEGURIER (71).

10°) le ferrocyanure de potassium: JUSTIN-MUELLER (72).

11°) le phosphate de sodium: ELDRED et PENCE (73), GANASSINI et FABBRI (74).

On voit donc que l'ensemble des problèmes qui se rapportent à la recherche et au dosage de l'albumine urinaire, se présente d'une manière assez complexe, si on considère que chaque technique se propose d'éliminer l'un des obstacles dont nous avons parlé tout à l'heure. Cependant, quelques méthodes sont utilisables dans tous les cas et nous avons pensé que l'emploi, dans ce but, de la réaction du biuret pourrait présenter quelque intérêt. Récemment, en effet, BALATRE (75) a publié une note, inspirée des méthodes de FINE (76) et de KINGSLEY (77), relative à l'emploi de cette réaction en vue du dosage photométrique des protides sanguins. Il a proposé de plus une technique semblable pour le dosage de l'albumine urinaire. D'autre part, plusieurs auteurs : HILLER (78), AUTENRIETH (79), AUTENRIETH et MINK (80), ont déjà utilisé cette réaction dans le même but, selon des modalités un peu différentes. Nous avons entrepris une étude aussi complète que possible de la recherche et du dosage de l'albumine en utilisant la technique de BALATRE (81) telle qu'elle est décrite :

Technique pour le dosage de l'albumine urinaire

Précipiter l'albumine au moyen d'acide trichloracétique à 20 p.100 dans les proportions suivantes

Dose d'albumine par litre	Prise d'essai d'urine	Acide à 20 p.100
0.20 à 1 gr	10 cc	5 cc
0.50 à 2 gr	5 cc	2 cc
2 à 10 gr	1 cc	1 cc

Après centrifugation, décanter et reprendre le culot par :

2 cc de solution de soude à 20 p.100.

2 cc d'eau distillée.

1 cc de solution de sulfate de cuivre à 1 p.100.

Centrifuger à nouveau et examiner au colorimètre.

Modifications proposées pour cette technique

Comme nous le montrons plus loin (p. 61), nous avons été amenés à modifier un peu cette technique selon les trois points suivants :

1°) Précipitation de l'albumine.

Nous avons obtenu l'albumine au moyen de trois procédés différents :

a) par coagulation en milieu salé et convenablement acidifié.

b) par précipitation à l'acide trichloracétique à 20 p.100 comme nous venons de le voir.

c) par précipitation au moyen du réactif utilisé par CASOLARI (82) (voir IV - sang dans l'urine), c'est-à-dire :

Tungstate de sodium.....	6 gr
Eau distillée.....qs.pour	100 cc
Acide acétique cristallisable...	4 cc

L'expérience nous a montré qu'utilisé dans les proportions indiquées (à 10 cc d'urine acidifiés à un pH voisin de 4 au moyen d'acide acétique au 1/10e, ajouter 1 cc de réactif par gramme d'albumine par litre), ce réactif provoquait la précipitation complète de l'albumine.

2°) Composition des réactifs.

La rédaction : "Lessive de soude à 20 p.100" donnée par l'auteur étant ambigue, nous avons succes-

sivement utilisé la solution contenant 20 gr. de soude pour 100 cc et celle contenant 20 cc de lessive de soude pour 100 cc (soit en fin de compte une solution à 8 grammes pour 100 cc).

Nous verrons plus loin tout le parti qu'on peut tirer de cette dernière concentration dans la recherche de l'albumine.

3°) Dosage colorimétrique.

Nous avons utilisé, pour apprécier les colorations dûes aux réactions du biuret, l'électrophotomètre de MEUNIER avec l'écran vert, au diaphragme 5, avec des cuves de 10 mm d'épaisseur. Nous avons comparé la réaction sur l'albumine à un témoin sans albumine obtenu dans les mêmes conditions. Nous avons retenu les chiffres lus directement sur la graduation du tambour du photomètre, et transcrits en densités optiques.

C'est cette technique ainsi modifiée qui nous a servi de base, aussi bien pour la détermination quantitative de l'albumine urinaire que pour sa recherche (dans ce dernier cas, naturellement, sans évaluation photométrique).

I - RECHERCHE QUALITATIVE DE L'ALBUMINE URINAIRE

Ce problème, comme nous l'avons vu plus haut, doit surtout être envisagé pour les faibles doses contenues dans les urines troubles. GERARD (83) estime que la dose limite équivalente à la mention "traces d'albumine" est de 40 à 50 mg. par litre. Dans ce cas, GERARD (84) emploie l'acide trichloracétique comme réactif précipitant de l'albumine, et il compare le trouble obtenu à celui donné par addition d'alcool de menthe officinal (une goutte de ce dernier provoque un trouble identique à celui donné par 40 mg d'albumine par litre précipités par l'acide trichloracétique).

Mais il s'agit ici d'urines limpides. Dans le cas d'urines troubles, il devient impossible d'ap-

précier par néphélémétrie le louche provoqué par une quantité aussi faible d'albumine. ZOTIER (85) rejette l'emploi, comme clarifiant, des poudres inertes (talc, kaolin) qui fixent totalement ou partiellement les albumines. Il préfère clarifier l'urine par le permanganate de potassium dont il détruit l'excès avec de l'eau oxygénée. FLORENCE (86) a recours dans le même cas à un autre procédé : comme GERARD, il utilise l'acide trichloracétique comme agent précipitant; il tente d'apprécier un louche par comparaison, puis il confirme la présence de l'albumine en pratiquant sur le dépôt obtenu par filtration et séché, la réaction de MILLON et la réaction xanthoprotéique. L'emploi de ces réactions a été critiqué par FLEURY et DELAUNEY (87) qui ont montré qu'elles n'étaient pas absolument spécifiques, bien que suffisamment sensibles (autant que la chaleur ou l'acide nitrique à 10 ou 20 mg. par litre).

A la suite de ces considérations, nous avons fixé à quelques dizaines de mg. par litre (20 à 50) les doses d'albumine qui devraient être facilement décelées dans une urine par une bonne technique. Nous avons ainsi utilisé des urines contenant 50 mg. d'albumine par litre, obtenues de 2 manières différentes :

1°) une urine normale, additionnée d'une quantité nécessaire et suffisante d'une solution d'ovalbumine.

2°) une urine albumineuse, de titre connu exactement par pesée, diluée au moyen d'une urine normale afin d'obtenir la concentration voulue.

Voici la technique que nous proposons pour la recherche de l'albumine dans de telles urines.

TECHNIQUE DE RECHERCHE DE L'ALBUMINE

dans le cas de faibles doses.

Opérer sur 20 à 30 cc d'urine (contenu d'un gros tube à centrifuger). Acidifier l'urine à un pH voisin de 4 (vérifier au moyen du rouge de méthyle) par addition d'acide acétique au 1/10e et précipiter l'albumine avec 1 à 2 cc. du réactif à l'acide tungstique (de CASOLARI 88). Centrifuger rapidement

pendant quelques minutes. Décanter. Laisser égoutter le tube par renversement sur du papier filtre. Reprendre le culot de centrifugation par :

1 cc de solution de lessive de soude à 20 p.100 (soit 8 g. de soude pour cent cc)

puis ajouter successivement:

1 cc d'eau distillée.

0 cc 5 de solution de sulfate de cuivre à 1 p.10

Dans ces conditions, on apprécie facilement la teinte bleu foncée ou violacée obtenue avec l'albumine par comparaison avec la coloration bleu claire du témoin, pour des doses d'albumine de l'ordre de 0 gr 050 et 0 gr 025 par litre.

N.B.- Il est possible qu'une partie des pigments ou des composés qui provoquent le trouble de l'urine, soit entraînée lors de la précipitation avec le réactif de CASOLARI. Dans ce cas, il faut tenir compt de la coloration propre apportée par le culot de centrifugation en faisant un tube témoin de la manière suivante : reprendre un autre culot de centrifugation par :

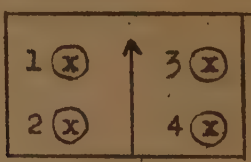
1 cc de solution de lessive de soude à 20 p.100.

1 cc d'eau distillée.

L'appréciation de la réaction se fait en utilisant le comparateur de WALPOLE selon le schéma suivant :

1 - eau distillée et 2 - réaction du biuret sur le culot de centrifugation.

3 - témoin du culot et 4 - témoin du biuret.



JUSTIFICATION DE LA TECHNIQUE -

Nous envisagerons tout d'abord l'influence de la composition des réactifs, puis nous examinerons la sensibilité et la spécificité de la méthode.

1°- COMPOSITION DES REACTIFS

Nous avons déjà vu que la solution de soude à 20 p.100 avait été remplacée par une solution à 8 p. 100. Cette substitution a paru favorable dans le cas de la recherche de l'albumine urinaire.

En effet, les témoins obtenus dans les conditions précédemment citées sont d'une coloration bleu clair : l'expérience montre que l'addition de quantités très faibles d'albumine provoque l'apparition de colorations bleu foncées ou violacées qu'il est facile de déceler par comparaison avec des témoins.

Dans les mêmes conditions, les témoins obtenus avec la solution de soude pure à 20 p.100 sont beaucoup plus colorés et il est difficile d'apprécier autrement que par photométrie les changements de teinte survenus par suite de la présence de traces d'albumine.

De même, nous avons constaté que l'emploi de solutions plus diluées (3 p.100 de soude) et de solutions plus concentrées de sulfate de cuivre (20 p. 100), comme le fait HILLER (89), ne favorise pas la formation de teintes aussi nettes et franches que dans le premier cas.

2°- SENSIBILITE DE LA TECHNIQUE

En opérant selon la technique décrite plus haut, il est très facile de retrouver des doses de 50 mg/litre d'albumine sur des urines claires en opérant sur des prises d'essai de 20 cc, le volume final de solution colorée étant de 5 cc; ou sur des prises d'essai de 10 cc en réduisant à 2 cc 5 le volume final. Enfin on obtient le même résultat avec une urine à 25 mg/litre en opérant sur 20 cc d'urine, le volume final étant de 2 cc 5.

Dans le cas d'urines troubles, impossibles à clarifier par filtration, il se produit, lors de la précipitation de l'albumine, un entraînement plus ou moins important de matières en suspension et de pigments. Dans ce cas, il y a lieu pour apprécier la réaction finale, de tenir compte de la coloration due au précipité.

3°- SPECIFICITE

Nous avons recherché dans quelle mesure cette technique de recherche de l'albumine urinaire était spécifique; nous avons donc examiné l'influence de corps voisins de celle-ci : pseudo-albumine et albumines thermo-solubles. Enfin nous avons envisagé l'action du pus qu'on demande souvent de rechercher en même temps que l'albumine.

a) Pseudo-albumine

Nous prenons la pseudo-albumine dans le sens défini par GRIMBERT et DUFAU (90).

On rencontre celle-ci dans l'urine, selon les auteurs, soit à l'état normal, soit seulement à l'état pathologique. Quoiqu'il en soit, il est nécessaire, dans les cas de grossesse notamment, de la différencier tout spécialement de l'albumine vraie, car elle n'a, contrairement à celle-ci, aucune signification pathologique.

On tend à admettre qu'elle se trouve toujour dans l'urine de Femme enceinte à une dose assez faible environ 0 gr.05 par litre (PECKER 91) ou 0,10 et 0,15- voire même 0.22 (ZOTIER 92). Sa présence dans les urines de Femme enceinte peut donc amener à des erreurs grossières si on utilise une technique non spécifique.

Nous avons donc examiné des urines de Femme enceinte, provenant d'une seule émission, reconnues pseudo-albumineuses et exemptes d'albumine vraie par les épreuves combinées de GRIMBERT et DUFAU (93), et de ZOTIER (94). Etant donné les faibles quantités de pseudo-albumine rencontrées dans ces urines, nous avon dû opérer sur des volumes assez importants (environ 50 cc) d'urines clarifiées par filtration. Dans ces

conditions, la précipitation au réactif de CASOLARI donnait des louches plus ou moins accentués, parfois difficiles à centrifuger.

Quoiqu'il en soit, dans les cas les plus favorables, nous avons pu vérifier que la pseudo-albumine donnait des réactions faibles, mais nettes avec le sulfate de cuivre en milieu alcalin.

En conclusion, si le procédé est acceptable, il ne paraît pas qu'on puisse se baser sur les preuves du biuret pour reconnaître la présence exclusive de petites quantités d'albumine, lorsqu'elles se trouvent en présence de pseudo-albumine. L'épreuve de GRIMBERT et DUFAU devra encore être utilisée pour les différencier.

b) Albumines thermo-solubles, dites de BENCE-JONES.

Ces albumines ne se rencontrent dans l'urine que dans des cas assez rares. Elles sont coagulées vers 50-60° et se dissolvent lorsqu'on élève la température, avant de reprécipiter par refroidissement.

Nous avons pu étudier deux échantillons d'urines contenant de ces albumines :

1°) le premier ne contenait pas d'albumine vraie. Nous avons porté l'urine rapidement à l'ébullition et séparé par centrifugation le précipité formé à froid. Celui-ci a donné avec le sulfate de cuivre en milieu alcalin une réaction colorée très intense.

2°) le second échantillon contenait en plus de l'albumine vraie. Nous avons porté à l'ébullition en milieu acide et convenablement salé, et filtré bouillant. Comme précédemment, l'albumine thermosoluble séparée, après refroidissement, par centrifugation, a donné une réaction colorée intense.

Nous avons enfin dosé par pesée selon la technique habituelle le bloc albumine vraie - albumines thermo-solubles : soit 11 gr 33 par litre. En même temps, nous avons additionné de sulfate de cuivre en milieu alcalin l'urine totale, puis la même urine, débarrassée de ses albumines par coagulation. Par dif-

férence, il était facile d'apprécier l'intensité de la coloration dûe aux albumines et, en se reportant à une courbe dont nous verrons plus loin le mode d'obtention, nous avons évalué la teneur globale en albumines à 10 gr 90 par litre.

Ceci nous montre que les albumines thermosolubles ont un pouvoir biurétique voisin de celui de l'albumine vraie et qu'il est possible en utilisant la technique décrite plus haut, de déceler la présence de ces albumines dans l'urine. En outre, il est également possible de les doser en se conformant aux prescriptions de la méthode de dosage qu'on trouvera plus loin.

c) Pus

On trouve assez souvent le pus associé à l'albumine et nous avons cherché s'il n'avait pas une action quelconque sur la réaction du biuret. Voici les quelques observations malheureusement incomplètes que nous avons pu faire à ce sujet. Les doses d'albumine ont été déterminées par précipitation à l'acide nitrique en utilisant la méthode de l'anneau-limite.

1er cas - Urine à 0gr.06 par litre environ.

Nous avons opéré la précipitation au moyen du réactif de CASOLARI sur l'urine totale et sur l'urine clarifiée par centrifugation.

Dans les deux cas, la dose trouvée est 0 gr.42 par litre.

De plus, le résidu de centrifugation de 200 cc d'urine totale a donné, 24 heures après le dosage précédent, une réaction du biuret nettement positive.

2ème cas - Urine à 0gr,12 par litre.

Précipitation au moyen du réactif de CASOLARI sur l'urine totale (sans centrifugation): nous avons trouvé 0 gr.83 par litre, puis de nouveau 0 gr.78 après quatre jours de conservation sous toluène à la glacière.

3ème cas - Urine sans albumine, contenant du pus.

Après précipitation au moyen du réactif de CASOLARI, le culot de centrifugation donne une réaction du biuret positive.

La présence de pus dans l'urine semble donc gêner la recherche de l'albumine par suite de l'introduction d'éléments biurétiques étrangers dans la réaction.

CONCLUSIONS

La réaction au sulfate de cuivre en milieu alcalin permet donc la recherche de quantités très faibles d'albumine dans l'urine. Cependant il ne faudra pas oublier que sa spécificité n'est pas rigoureuse. En conséquence, si on veut utiliser cette technique avec toute la sécurité voulue, il y aura lieu de s'assurer auparavant de l'absence de corps voisins de l'albumine vraie. En fait ces dernières restrictions limitent beaucoup l'emploi de la réaction du biuret comme moyen de recherche de faibles quantités d'albumine dans l'urine.

II - DOSAGE DE L'ALBUMINE URINAIRE

Le dosage colorimétrique de l'albumine urinaire s'effectue selon un procédé voisin de celui de la recherche que nous avons exposé plus haut.

TECHNIQUE PROPOSEE -

Réactifs

1 - Réactif à l'acide tungstique (de CASOLARI 95).

2 - Acide acétique au 1/10e.

3 - Solution de lessive de soude à 20 p.100 (soit 8 gr. pour cent cc.).

4 - Solution de sulfate de cuivre (à 5 OH_2) à 1 p.100.

Mode opératoire

Mesurer dans un tube à centrifuger une prise d'essai telle que la dose d'albumine contenue soit comprise entre 2 et 10 mg.

Acidifier, s'il y a lieu, à pH voisin de 4,0 au moyen d'acide acétique au 1/10e. Précipiter l'albumine au moyen du réactif de CASOLARI (pour 10 cc d'urine, 1 cc par gramme d'albumine par litre).

Centrifuger rapidement, Décanter et laisser le tube retourné jusqu'à ce qu'il soit complètement égoutté.

Reprendre le culot de centrifugation par 2 cc de lessive de soude à 20 p.100, puis ajouter successivement 2 cc d'eau distillée et 1 cc de solution de sulfate de cuivre. Mélanger. Centrifuger de nouveau. Comparer la coloration obtenue à un témoin obtenu avec le mélange suivant après centrifugation :

2 cc de solution de lessive de soude à 20 p.100.

2 cc d'eau distillée.

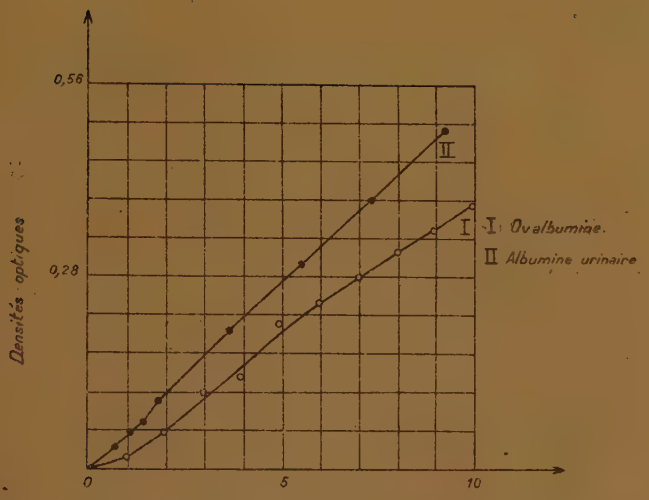
1 cc de sulfate de cuivre à 1 p.100.

ETUDE DE LA METHODE -

1°) Etalonnage du photomètre. Choix de la solution étalon.

Une première courbe d'étalonnage du photomètre a été déterminée en traitant, selon la technique décrite, une solution d'ovalbumine. Celle-ci était préparée selon la méthode de MESTREZAT (96) pour le dosage néphélémétrique de l'albumine du liquide céphalorachidien. La concentration d'albumine de cette solution était déterminée d'autre part très exactement par la méthode pondérale.

En traitant des quantités variables de cette solution, nous avons obtenu la courbe suivante où sont portées en abscisses les quantités d'albumine en mg. et en ordonnées les densités optiques correspondantes



Courbes obtenues avec la réaction du biuret sur des albumines diverses

Plusieurs dosages furent alors effectués selon la technique que nous venons de décrire sur des urines dont la quantité d'albumine par litre était déjà connue par la méthode pondérale ou par celle de l'anneau-limite.

Dose trouvée pondéralement	Dose trouvée au photomètre
0,50	0,80
0.15	0.05
6.60	9.60
10.40	12
0.45	0.68
3.70	4.80
19.80	24

L'ensemble de ces résultats fit ressortir des erreurs systématiques par excès dans la méthode du biuret.

C'est pourquoi nous avons établi une deuxième courbe d'étalonnage du photomètre (II) à partir d'une albumine urinaire. Dans ce but, nous avons traité une urine limpide selon la même technique que précédemment. Voici les résultats obtenus avec cette courbe à partir d'autres échantillons d'urines connus :

Dosage par pesée en g. par litre	Dose trouvée (en g. par litre) courbe n°. II	Erreur relative °/.
3.64	3.35	- 7,96
3.60	3.37	- 6.39
2.10	2.15	+ 2.38
2.41	1.77	-26.5
1.62	1.50	- 7.40
0.74	0.72	- 2.70
2.41	2.47	+ 2.48
0.67	0.73	+ 8.95
7.26	7.20	- 0.82
6.20	6.70	+ 8.06

L'emploi d'albumine urinaire comme étalon permet donc une très sensible amélioration dans l'ensemble des résultats, mais il subsiste encore plusieurs erreurs importantes dûes à l'intervention d'autres facteurs.

2°) Influence du mode de précipitation

Nous avons étudié 3 modes de précipitation: 1°) coagulation par la chaleur; 2°) acide trichloracétique et 3°) acide tungstique, en établissant pour la même urine albumineuse trois courbes d'étalonnage en fonction de sa dilution.

a) par coagulation.

Le traitement direct par le sulfate de cuivre en milieu alcalin n'a pas été possible sur l'albumine coagulée selon les procédés habituels. Il se produit, sous l'effet de la chaleur, une dénaturation partielle qui empêche ultérieurement la solubilisation totale du

coagulum dans la soude diluée. Le test par coagulation à chaud étant admis comme le plus spécifique en vue du dosage de l'albumine, nous n'avons pas voulu renoncer à cette comparaison. Nous avons tenté de remédier à cet inconvénient en opérant par différence, la réaction du biuret étant faite sur l'urine totale, puis sur la même urine débarrassée de son albumine par coagulation. Voici le détail de chaque opération :

1 - première mesure sur l'urine totale.

Elle est faite après centrifugation, sur le liquide coloré obtenu de la manière suivante :

2 cc d'urine diluée (concentration identique à celle du filtrat qui sert pour la troisième mesure).

2 cc de solution de lessive de soude à 20 p.100.

1 cc de solution de sulfate de cuivre à 1 p.100.

On trouve alors n = A.

2 - deuxième mesure sur l'urine totale pour tenir compte de sa coloration propre.

On compare à de l'eau distillée après centrifugation, si besoin est, la coloration du mélange :

2 cc d'urine diluée comme précédemment.

2 cc de solution de lessive de soude à 20 p.100.

1 cc d'eau distillée.

On trouve n = B.

3 - troisième mesure sur le filtrat débarrassé de l'albumine par coagulation dans les mêmes conditions qu'en I.

On trouve n = C.

4 - quatrième mesure sur le filtrat pour tenir compte de sa coloration propre comme en 2.

On trouve n = D.

La mesure qui correspond à la coloration dûe à la réaction du biuret sur l'albumine, sera exactement :

$$(A - B) - (C - D).$$

b) par précipitation au moyen de l'acide trichloracétique.

On tient compte également de la coloration propre du culot de centrifugation : celui-ci est repris par :

2 cc de solution de lessive de soude à 20 p.100.

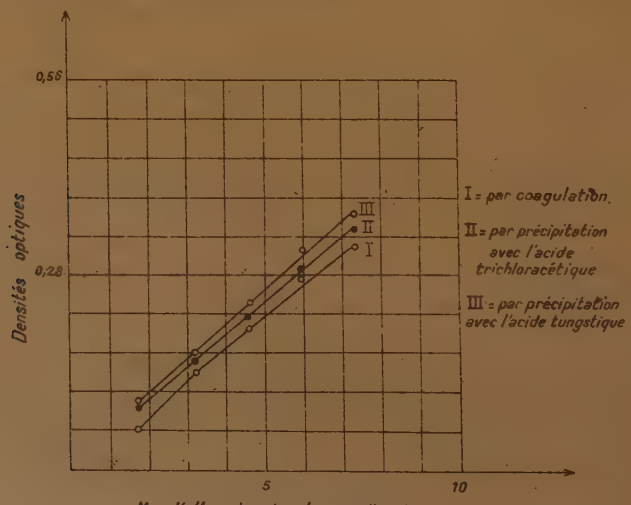
3 cc d'eau distillée.

On centrifuge si besoin est. On compare à l'eau distillée le liquide obtenu pour connaître son absorption propre.

c) par précipitation au moyen du réactif à l'acide tungstique (de CASOLARI 97).

Comme en b, on tient compte de la coloration dûe au culot de centrifugation.

L'ensemble de ces opérations a été effectué sur une urine contenant 21 gr.50 d'albumine par litre (titre connu par la méthode pondérale), que nous avons soumise à des dilutions successives. Nous avons ainsi obtenu les 3 courbes suivantes.



Courbes obtenues à partir de la même urine par des moyens différents

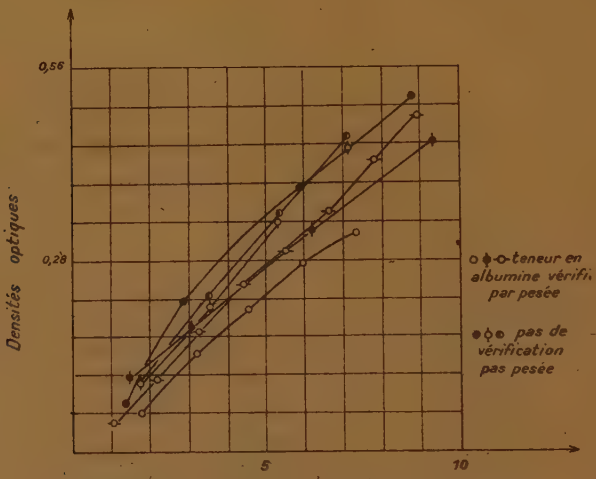
Celles-ci sont sensiblement décalées les unes par rapport aux autres, tout en restant à peu près parallèles. Si on considère comme spécifique la méthode par coagulation, il apparait que l'acide trichloracétique précipite des corps biurétiques autres que l'albumine vraie et que l'acide tungstique en précipite encore plus. Ceci semble en rapport avec une note de BECKMANN et ses collaborateurs (98). Ceux-ci ont signalé en effet la présence dans certaines urines d'une protéine soluble dans l'acide trichloracétique, ce qui se trouve confirmé dans le tableau suivant.

Chiffre donné en gr./l.	Mesure des densités optiques après précipitation tungstique ou trichloracétique.		Chiffres en gr/l correspondant à II et III	
I	II	III		
0.51	0.268	0.215	0.51	0.45
0.67	0.397	0.347	0.75	0.73
1.15	0.299	0.271	1.42	1.41
1.41	0.266	0.266	1.65	1.65
1.62	0.268	0.268	1.71	1.85
2.10	0.403	0.397	2.30	2.28
3.10	0.366	0.347	3.70	3.70
3.60	0.165	0.165	3.47	3.75
5.90	0.212	0.179	8.20	7.50
19.80	0.196	0.176	18.50	16.75

L'examen des résultats des colonnes II et III montre que l'acide tungstique précipite un corps biurétique contenu dans certaines urines. D'autre part, la comparaison des résultats obtenus au moyen des courbes n.° 2 et des chiffres donnés montre de grandes irrégularités. L'utilisation de ces courbes comme référence ne permet pas d'obtenir avec n'importe quelle urine de chiffres suffisamment précis. C'est pourquoi nous avons été amenés à nous demander dans quelle mesure il était possible de les utiliser.

3°) La courbe obtenue avec une urine albumineuse à l'aide d'un des modes de précipitation ci-dessus permet-elle de déterminer la concentration en albumine d'urines albumineuses d'autres provenances?

L'examen de plusieurs urines, contenant chacune une dose suffisamment élevée d'albumine, nous a permis de constater qu'il n'en était rien. Chaque courbe établie en fonction de la concentration (dilution d'une urine albumineuse avec une urine normale) est sujette à des variations individuelles. On obtient un faisceau de courbes non parallèles ainsi que le montre le graphique suivant.



Mg. d'albumine dans la prise d'essai. Courbes obtenues avec la méthode par coagulation (méthode par différence)

On constate que la pente de la courbe varie selon l'urine traitée. De la sorte, il n'est donc pas permis de résoudre le problème d'une manière simple en utilisant une seule courbe de référence (même obtenue avec un seul mode de précipitation). La méthode ne peut fournir ainsi qu'un ordre de grandeur en utilisant une courbe de référence moyenne. Peut-être fournirait-elle des résultats exacts dans le cas d'urines provenant d'un même malade et permettrait-elle de suivre avec facilité et précision l'évolution d'une néphrite, mais nous n'avons pas poursuivi nos recherches dans cette voie. Cependant, si on calcule les erreurs qu'on peut obtenir en utilisant une courbe de référence moyenne pour les urines que nous avons étudiées, on constate qu'elles sont de l'ordre de 6,25 p.100 à 12,5 p.100 dans les cas les plus défectueux.

CONCLUSIONS

Les résultats obtenus par application de notre technique peuvent être acceptés, dans une certaine mesure, par les besoins de la clinique, mais il convient de ne pas oublier que :

1°) la recherche dépend du mode de précipitation utilisé.

2°) la courbe d'étalonnage doit être établie avec une urine albumineuse.

3°) la courbe d'étalonnage est fonction, dans une certaine mesure, de la valeur propre de l'albumine il serait plus correct d'utiliser pour cet étalonnage un mélange d'un aussi grand nombre que possible d'urines albumineuses provenant de divers sujets.

Note sur la conservation des solutions d'albumine.

Nous avons utilisé à diverses reprises au cours de ce travail des solutions d'albumine (notamment pour la recherche du sang dans l'urine et pour l'étalonnage du photomètre en vue du dosage de l'albumine urinaire).

Devant les difficultés que nous avons éprouvé pour la préparation de ces solutions, nous avons pensé que le problème de leur conservation pouvait présenter quelque intérêt pratique. Nous avons déjà vu que ces solutions se préparaient selon la technique de MESTREZAT (99) qui permettait d'obtenir facilement des solutions de titre variable (0.50 à 2 - 3 gr par litre).

La stabilisation des sérums ou du plasma au moyen de la chaleur et du formol a déjà été étudiée par MERIEUX (100), DUJARRIC de la RIVIERE et LUTZ (101). Ces auteurs ont montré qu'il suffisait, pour obtenir cette stabilisation, d'ajouter aux produits à conserver du formol officinal (à 40 p.100) dans la proportion de 2.5 p.100 et de chauffer le mélange à 37° pendant un jour.

Nous avons opéré de même, soit directement sur des dilutions de sérum, soit sur des solutions d'albumine, mais en les laissant trois jours à l'étuve à 37°.

Les solutions d'albumine ainsi traitées ont été conservées d'une part à la température du laboratoire et d'autre part à celle de la glacière.

En même temps, une autre portion, non traitée au formol, a été conservée seulement sous toluène dans les mêmes conditions. Les dosages colorimétriques ont été faits à partir de 5 cc. de prise d'essai après précipitation tungstique (nous avons constaté que, dans le cas des solutions d'albumine, la précipitation trichloracétique donnait les mêmes résultats). Le volume final de la solution colorée était aussi de 5 cc. Voici les résultats obtenus avec plusieurs solutions:

1°) Solution de sérum à 1 p.100 (sérum antistreptococcique périmé).

n = 0.207 avant addition du formol.

n = 0.156 après un séjour de 24 h. à l'étuve.

n = 0.184 après 2 mois de conservation à la température du laboratoire.

n = 0.173 après 5 mois de conservation au laboratoire.

(n est exprimé en densités optiques).

2°) Solution d'ovalbumine.

n = 0.210 avant action du formol.

n = 0.215 après action du formol pendant 3 jours à 37°.

Conservation pendant:	3 jours	30 jours	3 mois	1 an
a- sous toluène au laboratoire.	0.235	0.221	0.224	0.224
b- sous toluène à la glacière.	—	0.196	0.221	0.210
c- + formol au laboratoire.	0.232	0.221	0.218	0.235
d- + formol à la glacière.	0.221	0.215	0.221	0.218

3°) Solution d'ovalbumine.

n = 0.204 avant action du formol.

Conservation pendant :	3 mois	6 mois
a- sous toluène au laboratoire.	0.229	0.226
b- sous toluène à la glacière.	0.232	0.229
c- + formol au laboratoire.	0.207	0.201
d- + formol à la glacière.	0.212	0.215

Le traitement des solutions d'albumine par le formol aurait une action double, comme l'a montré DUJARRIC de la RIVIERE: 1- méthylénisation dès le premier jour; et 2- action secondaire lente, mais progressive. Nous avons montré d'autre part qu'une formolisation trop poussée (addition de 10 p.100 de formol), dans les mêmes conditions que précédemment, provoquait une dénaturation progressive de l'albumine :

n = 0.170 avant action du formol.

n = 0.095 après 65 jours de conservation à la température du laboratoire.

n = 0.039 après 5 mois de conservation.

CONCLUSIONS.

L'examen des tableaux précédents montre qu'il est facile de conserver une solution d'albumine pendant un temps assez long. La formolisation provoque une faible diminution du pouvoir biurétique, mais elle permet de conserver à la solution d'albumine toute son intégrité, la présence de toluène étant gênante pour effectuer certaines précipitations.

BIBLIOGRAPHIE

37- AGUIAR (A. de) - Rev. Quim. Pura applicada 1924-I-202 ; d'après Ch. Abst. 1925-19-(2)-2352.

54- ANGIOLANI (A.) - Giorn. Farm. Chim. 1920-69-142.

6- AUFRECHT (Dr.) - Pharm. Ztg. 1917-62-38

79- AUTENRIETH (W.) - Munch. med. Woch. 1917-64-241

80- AUTENRIETH (W.) et MINK (F.) - Munch. med. Woch. 1915-62-1417

75-81- BALATRE (P.) - Ann. Biol. clin. 1947 -p.86

22- BALLONI (A.) - Minerva Med. 1935-1-259

7- BANFI (R.F.) - Anales Farm. Bioquim. (Buenos-Aires) 1936-7-17 ; d'après Ch. Abst. 1937-31-722

98- BECKMANN (W.), HILLER (A.), SHEDLOVSKY(T.) et ARCHIBALD (R.M.) - J. biol. Chem. 1943-148-247

55- BERGLUND (H.) et SCRIVER (W. de M.) - Act. med. Scand. 1935-86-82

16- BUDDE (T.) - Apoth. Ztg. 1927-42-754

82-88-95-97- CASOLARI (A.) - Biochim. Terap. sper. 1932-19-213

19- CAVAZANNI (E.) - Wien. klin. Woch. 1921-34-121

32- CLAPP (W.B.) et COHEN (B.) - New Engl. J. Med. 1930-203-1237

23- CORZO (R.) - Apoth. Ztg. 1907-22-6

67- DHOMMEE (R.) - J. Pharm. Chim. 1916-(7)-13-241

2-40- DROSTE (R.) - Pharm. Zentr. 1915-56-739

101- DUJARRIC de la RIVIERE (R.) et LUTZ (A.)- Bull. Acad. Med. 1946-130-495

62- DUPUY (L.) - Presse médicale 1920-28-104

33- EDELMANN (A.) - Wien. klin. Woch. 1916-29-901.

73- ELDRED (F.R.) et PENCE (C.M.) - J. Amer. Pharm. Assoc. 1913-2-154

12- ELMER (W.P.) - St Louis Med. Rev. Août 1907 ; d'après Ch. Abst. 1908-6-3108

29- ERDMANN - Schweiz. Apoth. Ztg. 1914-52-162

48- EXTON (W.G.) - J. Lab. clin. Med. 1925-10-722

43- FEIGL (P.) et ANGER (V.) - Mikrochim. Act. 1937-2-107

76- FINE (J.) - Biochem. J. 1935-29-799

10- FLEISCHMANN (C.) - Pharm. Ztg. 1926-71-592

39-87- FLEURY (P.) et DELAUNEY (P.) - J. Pharm. Chim. 1929-(8)-10-529

21-38-51-86- FLORENCE (A.) - J. Pharm. Chim. 1925-(8)-2-97

46-49- FOLIN (O.) et DENIS (W.) - J. biol. Chem. 1914-18-273

74- GANASSINI (D.) et FABBRI (P.) - Boll. Chim. Farm. 1919-58-313

52-83-84- GERARD (G.) - Bull. Sc. Pharm. 1921-28-466

17- GLAESGEN (Dr.) - J. Pharm. Chim. 1911-(7)-4-360

60- GOODMAN (E.H.) et STERN (S.) - J. Amer. Med. Assoc. 1908-51-2055

90-93- GRIMBERT (L.) et DUFAU (E.) - J. Pharm. Chim. 1906-(6)-24-193

78-89- HILLER (A.) - Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1927-24-385

50- JOLLES (A.) - Ber. Pharm. Ges. 1908-18-598

26- JOLLES (A.) - Z. physiol. Chem. 1912-81-205

66- JONES (H.E.) - Glasgow med. J. 1916-85-31

68- JOUVENET (A.) - Bull. Biol. Pharm. 1930-10-271

72- JUSTIN-MUELLER (E.) - Bull. Sc. Pharm. 1917-24-29

77- KINGSLEY (G.R.) - J. biol. Chem. 1939-131-197

8- KUHL (H.) - Suddeutsch. Apoth. Ztg. 1930-70-665 ; d'après Ch. Abst. 1931-25-(1)-1854

9- LASH (G.) et REITSTOETTER (J.) - Munch. med. Woch. 1920-67-484

65- LENK (E.) - Z. angew. Chem. 1917-30-(1)-45

11- LENZ (F.) - Munch. med. Woch. 1917-64-1267

34- LIEBERS (F.) - Deutsch. med. Woch. 1916-42-325

57- LILIENDAHL-PETERSEN (A.). - Ugesk. Laeg. 1918-80-1054

4- LINDBERGER (B.) - Act. med. Scand. Suppl. 1926-16-682

59- MATTICE (A.F.) - Arch. intern. Med. 1910-5-313

13-20-25- MAYER (O.) - Z. anal. Chem. 1919-58-337

100- MERIEUX (C.) - Bull. Acad. Med. 1946-130-506

96-99- MESTREZAT (W.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1924-6-694

5- MICHEL (F.) - Chem. Ztg. 1911-35-183

27- MINIACI (F.) - Rev. Asoc. Bioquim. Argentina 1943-9-49 ; d'après Ch. Abst. 1945-39-(1)-720

42- MORIKAWA (T.) - Pharm. Ztg. 1909-54-612

36- MOUNIER (P.) - Bull. Biol. Pharm. 1930-n°10-248

91- PECKER (H.) - J. Pharm. Chim. 1932-(8)-15-18

71- PEGURIER (G.) - Répert. pharm. 1920-(3)-32-225

53- QUICK (A.J.) - J. Lab. clin. Med. 1923-8-615

18- RENAUX (M.) - J. Pharm. Belgique 1922-4-381

14- ROEPKE (M.H.) - J. amer. Vet. Med. Assoc. 1940-97-602; d'après Ch. Abst. 1941-35-(1)-1429.

1- SACHS (F.) - Deutsch. med. Woch. 1907-33-66

47- SAGASTUME (C.A.) et GHERZI (R.A.C.) - Rev. Fac. Cienc. quim. (La Plata) 1934-9-49 ; d'après Ch. Abst. 1935-29-(2)-3699

15- SAGASTUME (C.A.) et GHERZI (R.A.C.) - Rev. Fac. Cienc. quim. (La Plata) 1935-10-7

45- SARTORY (A. et R.) et MEYER (J.) - Bull. Biol. Pharm. 1937-n°39-503

28- SCHMIZ (E.) - Pharm. Ztg. 1914-59-187

64- SEILER - Schweiz. Apoth. Ztg. 1933-71-264

31- SIEBERS - Suddeut. Apoth. Ztg. 1916 ; d'après Ch. Abst. 1917-30-1444.

44- STEENSMA (F.A.) - Z. physiol. Chem. 1906-47-27

30- STEWART (U.P.) - J. Amer. Med. Assoc. 1918-71-1050

69- STRZYZOWSKI (C.) - Z. physiol. Chem. 1913-1-88

24-61- SUEYOSHI (Y.) - Mitt. med. Fac. Univ. Tokyo 1915-n°3 ; d'après J. amer. Med. Assoc. 1916-66-930

56- TAMAYO (L.E.) - Bol. Lab. mun. Guayaquil 1920-I-33 ; d'après Ch. Abst. 1920-14-3435

35- TANRET (C.) - Bull. Sc. Pharm. 1913-20-129

58- TSUCHIYA - Zentr. inn. Med. 1908-29-105

63- URBAN (M.) - C. R. Soc. Biol. 1939-130-818

70- VALLERY (L.) - C. R. Acad. Sc. 1911-153-1243

41- ZOICHE - Boll. Chim. Farm. 1913-52-504

3-94- ZOTIER (V.) - Bull. Sc. Pharm. 1931-38-337

85-92- ZOTIER (V.) - Bull. Sc. Pharm. 1924-31-87

Chapitre V

DETERMINATION DE LA RESERVE ALCALINE DU SANG

Une étude approfondie du pH sanguin montre que celui-ci est d'une fixité remarquable. On constate en effet que sa valeur oscille très légèrement entre 7,35 et 7,45 et ce, malgré l'afflux incessant dans le courant sanguin, de matières nutritives de réactions très diverses. Aussi cette stabilité ne peut s'expliquer que grâce à la présence dans le sang de systèmes tampons. Ceux-ci, destinés à maintenir l'équilibre ionique du sang, sont constitués par un ensemble de combinaisons entre des bases fortes et des acides faibles. Le plus important de ceux-ci est l'acide carbonique. On a cherché à estimer ce pouvoir-tampon du sang et c'est ainsi qu'on a été amené à doser, sous le nom de "réserve alcaline", la portion d'acide carbonique qui, dans le plasma, se trouve combinée à l'état de bicarbonates. Il existe en plus une fraction d'acide libre qu'on estime (dans les conditions normales de pH) au 1/20e environ de la portion combinée.

Le dosage de la réserve alcaline, tel qu'il vient d'être défini, s'effectue selon certaines techniques qui utilisent :

1°) une méthode directe : après acidification convenable au moyen d'un excès connu d'acide, on évalue en retour l'alcalinité libérée par le dégagement de l'acide carbonique.

2°) une méthode indirecte : on mesure la quantité d'acide carbonique qui se dégage du plasma acidifié et l'on calcule ensuite la fraction sous forme de bicarbonate.

Malgré les difficultés inhérentes à l'exécution de la seconde méthode, elle est néanmoins très usitée : des techniques bien définies permettent en effet d'évaluer avec précision l'acide carbonique.

Un tel dosage se fait :

1) par gazométrie : VAN SLYKE (1).

2) par titrimétrie : DIBBELT (2), NICLOUX (3), CREMER (4), CRISTOL (5).

A l'heure actuelle, la technique gazométrique est très employée par de nombreux laboratoires. Nous ne ferons ici que la mentionner: on la trouvera exposée suffisamment en détail dans les fiches du professeur FLEURY (6).

Cependant, malgré la faveur dont elle jouit encore à présent, on lui reconnaît aisément plusieurs inconvénients, notamment : la grande fragilité de l'appareil, la nécessité d'une quantité assez importante de mercure et l'emploi d'un caoutchouc à vide de très bonne qualité assurant l'étanchéité absolue de l'appareil. Bien que la technique soit fidèle et spécifique (sa sensibilité étant cependant liée à la construction de l'appareil qui permet des lectures volumétriques plus ou moins fines), on s'explique aisément l'hésitation de ceux qui se voient plus ou moins pressés de faire l'acquisition du matériel nécessaire au dosage de la réserve alcaline du sang.

Jusqu'ici les techniques volumétriques n'ont guère paru retenir l'attention. Ceci est dû surtout, semble-t-il, au fait que ces dosages nécessitent, eux aussi, un appareillage particulier et une mise au point assez délicate. Cependant nous tenons à formuler quelques remarques en leur faveur. Tout d'abord la manipulation est en général très simple à exécuter : en dehors de l'appareil, quelques réactifs courants sont seulement nécessaires. De plus, comme nous allons l'établir, les résultats obtenus, comparés avec ceux de la méthode de VAN SLYKE, sont satisfaisants.

Aussi nous avons entrepris l'étude d'une technique de dosage volumétrique de la réserve alcaline du sang. A cet effet, nous avons retenu dans leurs grandes lignes les résultats obtenus, il y a peu de temps, au laboratoire de M. P. FLEURY, par Mme FIEVET (7). Cet auteur a montré qu'au moyen d'un appareil à fixation dans le vide, créé par M. FLEURY, et d'une

technique de dosage des carbonates en milieu alcalin dûe à WINCKLER (8), il était facile de titrer, dans des conditions satisfaisantes, l'acide carbonique contenu, dans certaines solutions, à l'état combiné. Nous avons donc tenté de mettre au point, dans des conditions analogues, un dosage de l'acide carbonique du plasma en opérant sur une faible prise d'essai.

Avant d'aborder l'exposé détaillé de cette mise au point, nous avons pensé qu'il serait bon de rappeler brièvement la technique des quelques méthodes qui ont été proposées antérieurement en vue de ce dosage. Elles opèrent toutes suivant un même schéma : 1°) dégagement de l'acide carbonique du plasma au moyen d'un excès d'acide minéral ou organique, puis 2°) fixation du CO_2 sur une solution alcaline appropriée. Les appareils utilisés se composent essentiellement d'un ballon où s'effectue le dégagement du CO_2. Ce ballon communique par un tube aussi étanche que possible avec un second ballon où le CO_2, par une action physique quelconque, va se fixer sur la solution alcaline.

Des quatre méthodes que nous allons décrire, deux opèrent sous vide et les deux dernières, à la pression atmosphérique.

Technique de DIBBELT (9)

Appareil utilisé (fig. n°1): deux flacons bouchant émeri réunis par un gros tube recourbé. L'un des flacons possède au milieu de sa paroi un dispositif destiné à faire le vide dans l'appareil.

Réaction : sous l'action de l'acide oxalique concentré en B.

Fixation: en A, dans 80 cc. d'eau de baryte titrée.

Titrage: après 2 ou 3 jours, on détermine le nouveau titre de l'eau de baryte, devenue limpide, sur une partie aliquote de celle-ci, au moyen d'acide oxalique de titre connu.

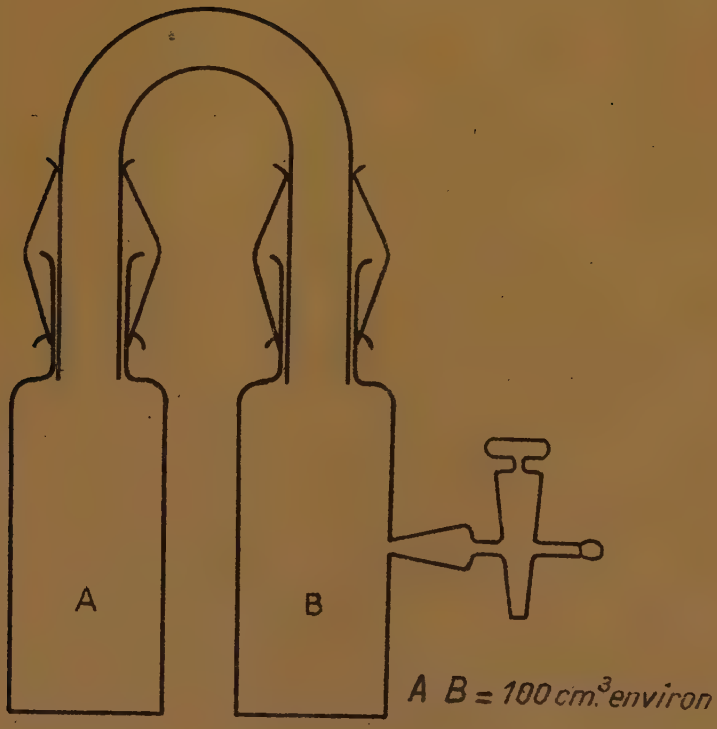


Fig. Nº 1 – *Appareil de Dibbelt*

Planche II

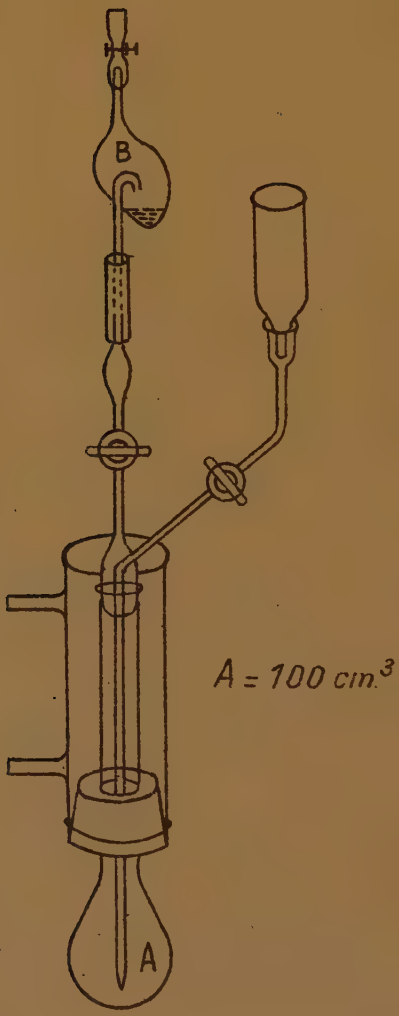
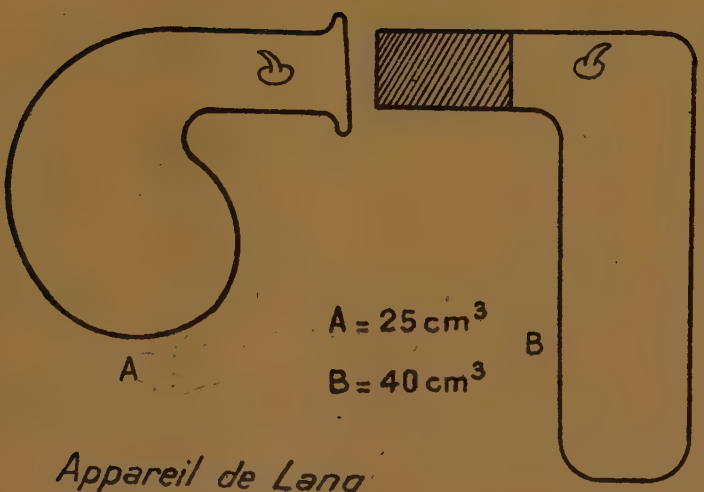


Fig.N°2_ *Appareil de Nicloux*



Appareil de Lang

Fig. N° 3

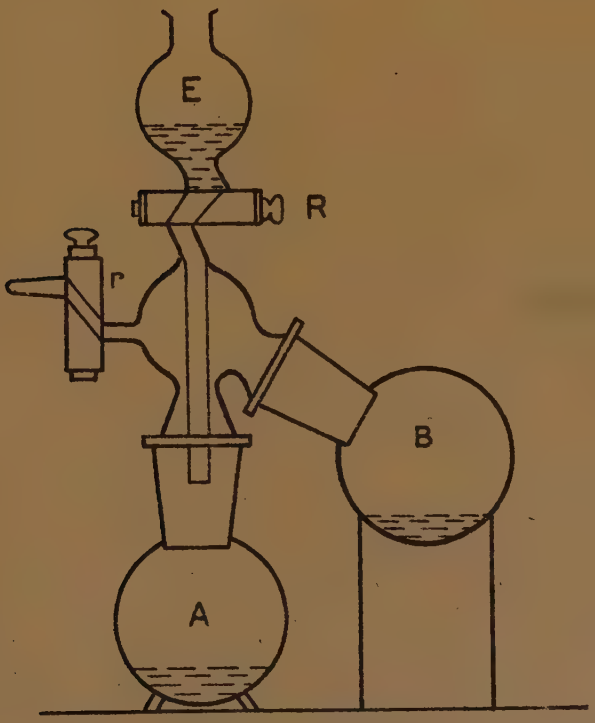


Fig. N° 5 - *Appareil d'absorption dans le vide*

Planche IV

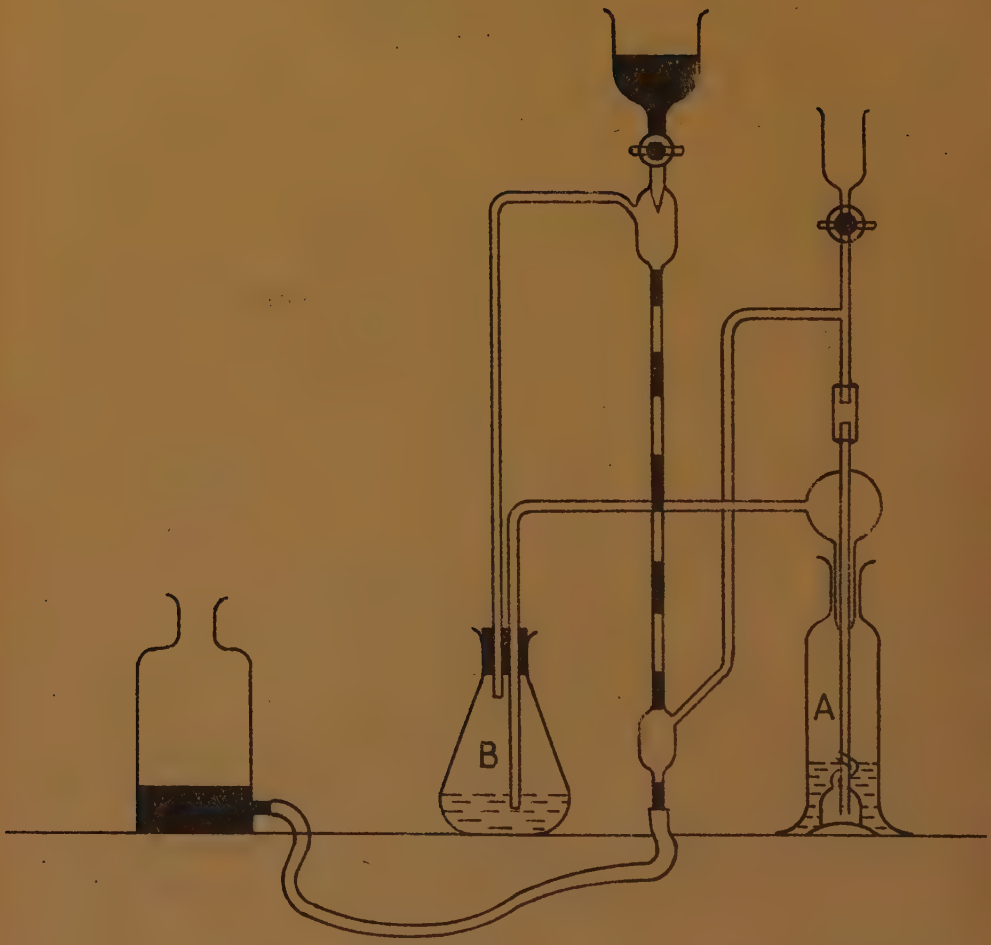


Fig. 4 _ *Appareil de Lescœur et Manjean.*

Technique de NICLOUX (10)

Appareil utilisé par l'auteur pour le dosage de l'oxyde de carbone dans le sang. (fig. n°2)

Réaction : au moyen d'acide chlorhydrique étendu, en A.

Fixation : sur de la potasse décarbonatée en B.

Titrage : après 7 minutes, on précipite le carbonate de la solution alcaline, sous forme de son sel de baryum. On dose celui-ci en le dissolvant dans une quantité connue d'acide chlorhydrique N/20 dont on titre l'excès au moyen de potasse N/20.

Technique de CREMER (11)

Appareil de LANG (12) (fig. n°3)

Réaction : au moyen d'acide sulfurique à 10 p.100 dans le ballon A.

Fixation : en B, sur un mélange d'eau de baryte et de chlorure de baryum; favorisée par une distillation obtenue en plongeant le ballon à réaction dans l'eau chaude et le ballon à fixation dans la glace.

Titrage : après 1 heure, on titre directement l'excès de baryte au moyen d'acide chlorhydrique N/20 contenant un peu de chlorure de baryum.

Technique de CRISTOL (13)

Appareil à entraînement continu par le mercure (fig. n°4)

Réaction : au moyen d'acide chlorhydrique au 1/3, dans le flacon A.

Fixation en B dans la baryte additionnée de chlorure de baryum.

Titrage, après 25 minutes, de l'excès de baryte par l'acide chlorhydrique N/50.

Nous n'entreprendrons pas ici de critiquer ces techniques ; néanmoins nous croyons devoir attirer l'attention sur les faits suivants :

1°) Utilisation d'une quantité assez importante de sang (5cc.) qu'il n'est pas toujours facile de se procurer, sauf pour la technique de CREMER qui opère sur 1cc.

2°) Longueur d'exécution de la technique de DIBBELT.

3°) Intérêt des méthodes de CREMER et CRISTOL. Cependant celles-ci opèrent en présence d'air et il semble assez difficile de connaître exactement son influence.

4°) Emploi du mélange : eau de baryte-chlorure de baryum pour fixer le CO_2. Cet emploi paraît souvent en défaut : il se forme rapidement en surface une pellicule de carbonate de baryum qui s'oppose à la fixation des dernières traces de CO_2.

5°) Emploi d'un acide titré N/50 par CRISTOL : cela n'accroît guère la sensibilité du dosage, le virage de l'indicateur n'étant pas net par suite de la dilution du milieu.

6°) Intérêt très grand de la technique de NICLOUX dont l'exécution est rapide; cependant la phase finale du titrage gagnerait à être abrégée.

L'appareil que nous avons utilisé pour ce dosage a déjà été décrit par Mme FIEVET (14) qui, en outre, a étudié systématiquement l'emploi d'un appareil à entrainement par l'air décarbonaté et d'une pipette de GROS (15). Le premier n'a pas donné de bons résultats. La seconde ne donne de résultats satisfaisants que si l'absorption du CO_2 s'effectue pendant 2 à 4 jours, ce qui nuit à la rapidité de la technique. Aussi nous avons utilisé un appareil à fixation dans le vide (fig. n° 5). Celui-ci se compose essentiellement d'un corps sphérique auquel sont adaptés: d'une part deux longs ajutages rodés destinés à supporter deux ballons de 25 à 30 cc.; d'autre part deux robinets dont l'un r sert à faire le vide et l'autre R, à

introduire dans l'appareil les liquides contenus dans l'ampoule supérieure E. Pour assurer un fonctionnement prolongé de ces robinets, il est conseillé de les graphiter, puis de les graisser.

TECHNIQUE PROPOSEE

Réactifs.

1 - Alcool octylique.

2 - Alcool éthylique.

3 - Solution saturée de chlorure de baryum (titre approximatif : 33 p.100).

4 - Soude décarbonatée N/10.

Selon SOERENSEN, préparer une solution concentrée de soude en dissolvant de la soude pure dans son poids d'eau. Après repos de 48 h., il se sépare un dépôt de carbonate de soude insoluble dans les solutions très concentrées de soude. Pour préparer 1 litre de solution N/10, il suffit de prélever 10 gr. de cette solution concentrée et de les diluer au moyen d'eau distillée bouillie et refroidie dans une atmosphère exempte de gaz carbonique. (On peut aussi amener à l'ébullition, à l'aide d'un vide convenable, de l'eau contenue dans un récipient placé sous une cloche à vide et laisser rentrer de l'air débarrassé de CO_2). Cette solution se conserve ainsi plusieurs mois sous huile de vaseline dans un flacon muni d'un siphon et d'une rentrée d'air par un flacon rempli de soude concentrée.

5 - Acide sulfurique N/20 exact.

6 - Acide sulfurique environ 10 N. (Acide sulfurique D = 1,83 I vol. et eau distillée 3 vol.)

Mode opératoire.

Dans le ballon B, introduire successivement:

0 cc.10 d'alcool éthylique.

1 cc. de solution saturée de chlorure de baryum.

1 cc.00 de soude N/10 décarbonatée.

Agiter légèrement pour mélanger et monter le ballon sur l'ajutage correspondant convenablement graissé.

Dans le ballon A, mesurer successivement :

Alcool octylique	3 gouttes
Soude N/10 décarbonatée	1 cc.
Plasma	1 cc.00

(Opérer sur le plasma obtenu de la manière habituelle pour la mesure de la réserve alcaline).

Agiter pour mélanger et monter le ballon sur l'ajutage correspondant.

Fermer le robinet R de l'ampoule supérieure et faire le vide dans l'appareil, au moyen d'une trompe à eau donnant un vide de l'ordre de 15-20 mm. de mercure. Fermer ensuite le robinet r dès que des bulles gazeuses commencent à se dégager dans le ballon B.

Mesurer dans l'ampoule E 2 cc. environ d'acide sulfurique 10 N. L'introduire goutte à goutte dans l'appareil, de manière que le dégagement de l'acide carbonique, favorisé par l'alcool octylique, soit aussi régulier que possible. Arrêter l'introduction de l'acide sulfurique juste à temps afin d'éviter une rentrée d'air par le robinet R. Abandonner l'appareil environ une heure à la température du laboratoire en agitant environ quatre à cinq fois pendant ce temps. D'une part, on laisse ainsi à l'acide carbonique le temps de se fixer complètement sur la soude ; et d'autre part, on favorise sa fixation en brisant, en B, la pellicule de carbonate qui a pu se former.

Avant la fin de l'opération, emplir d'acide sulfurique N/20 un microburette de MALMY (à 2,50 cc.). Faire rentrer doucement l'air dans l'appareil par le

robinet r. Retirer alors le ballon B de l'appareil ; y verser 2 à 3 gouttes de solution alcoolique de phénolphtaléine et titrer à l'acide sulfurique N/20 l'excès de soude N/10 resté dans le ballon, soit n cc. SO_4H_2 N/20.

Une opération à blanc (sans plasma) peut donner la valeur du témoin, soit N cc. SO_4H_2 N/20.

La valeur de la réserve alcaline pour 100 volumes de plasma est donnée directement par :

$$(N - n) \times 56.$$

Remarque.

Pour obtenir le chiffre N, on peut se contenter de titrer au moyen de l'acide sulfurique N/20 un mélange de :

{1 cc. de solution saturée de chlorure de baryum.
{1 cc.00 de soude N/10 décarbonatée.

on trouve ainsi A cc., soit par exemple 1 cc.97.

Il faut faire subir à ce résultat une correction empirique (B cc.). Pour cela, une fois pour toutes, on fait une série de dosages à blanc. Dans les conditions où nous opérons, 15 dosages nous ont ainsi donné une valeur moyenne de 1 cc.77. Ici la valeur à attribuer à B sera :

$$1,97 - 1,77 = 0cc.20$$

On aura donc directement et rapidement la valeur N du témoin :

$$N = (A - B) \text{ cc.}$$

ETUDE CRITIQUE ET JUSTIFICATION DE LA TECHNIQUE.

Cette étude a comporté deux temps :

1°) mise au point du procédé au moyen de solutions de carbonate de sodium.

2°) essais sur plasma.

I - ETUDE AVEC DES SOLUTIONS DE CARBONATE DE SODIUM.

Nous avons utilisé des solutions N de carbonate de sodium, dont le titre était exactement connu au moyen d'acide sulfurique N en présence d'hélianthine comme indicateur. De plus, nous avons vérifié que, après addition d'un excès de chlorure de baryum, cette solution de carbonate de sodium était neutre à la phtaléine une alcalinité indiquant la présence de soude libre, une acidité indiquant la présence d'un excès de CO_2. Diluées exactement au 1/10, ces solutions étaient telles que 0cc.50 correspondait à une réserve alcaline normale de 56 obtenue sur 1 cc. de plasma.

L'emploi de la technique primitive de WINCKLER (16) s'est montré satisfaisant lorsque les prises d'essai de la solution étaient comprises entre 3 et 10 cc, Rappelons que, dans cette technique, la fixation du CO_2 se fait uniquement sur la soude décarbonatée. Ce n'est qu'à une seconde phase du dosage que le carbonate de sodium formé est précipité sous forme de son sel de baryum en versant la solution sodique dans un excès d'une solution saturée de chlorure de baryum. Le titrage se termine alors comme précédemment Cette technique à été mise au point pour des volumes représentant 10 à 20 cc. de solution N/10.

Mais l'application d'une telle technique au dosage de 0 cc.50 de solution N/10 de carbonate de sodium a montré qu'elle donnait toujours des erreurs par excès : par exemple, au lieu de 0cc.99 en SO_4H_2 N/20, seulement 0,91 - 0,91 - 0,93 - 0,94 - 0,93 - 0,87.

De plus, nous avons constaté que de nombreux facteurs intervenaient dans ce dosage et nous avons tenté d'en faire une étude systématique.

1°) Etude de la précipitation des carbonates.

Celle-ci se fait, comme nous venons de le

voir, en versant la solution carbonatée et sodique dans un excès de chlorure de baryum.

Ainsi 1 cc. de soude N/10 décarbonatée, soumise à l'action du vide pendant 1/2 h, titre en SO_4H_2 N/20 successivement : 1,89 - 1,90 - 1,92.

Des échantillons identiques, soumis au vide, puis versés dans le chlorure de baryum (avec lavage du ballon ayant contenu la soude) ne donnent plus que : 1,67 - 1,71 - 1,75.

Le premier titrage montre donc l'action constante du vide sur la diminution du titre de la soude. Le second fait apparaître l'inconvénient d'une précipitation des carbonates sous forme de sels de baryum en versant le mélange alcalin dans un excès de chlorure de baryum comme le fait WINCKLER.

2°) Etude de l'action du vide.

Le mélange de :

(1 cc. de soude N/10.
(
(0 cc.80 de chlorure de baryum saturé.

correspond à 1 cc.95 SO_4H_2 N/20.

On le soumet au vide dans l'appareil déjà décrit pendant des temps variables et on titre de nouveau:

après 1 minute = 1,88
" 1/4 d'heure = 1,89
" 1/2 heure = 1,89
" 2 heures = 1,90.

3°) Etude de l'introduction de liquides dans l'appareil

Dans le ballon B, on mesure :

(1 cc. de soude N/10
(} = 1cc.96 SO_4H_2 N/20
(0 cc.80 de chlorure de baryum saturé)

On soumet le mélange au vide 1/4 d'heure = 1 cc.88 SO_4H_2 N/20.

Puis on répète la même opération en mesurant en A 1 ou 2 cc. SO_4H_2 10 N.:

- vide de 1/4 d'heure :
  1 cc. SO_4H_2 10.N; titrage = 1,86 SO_4H_2 N/20

- vide de 1/2 heure :
  1 cc. SO_4H_2 10.N; titrage = 1,86 SO_4H_2 N/20

- vide de 1/4 d'heure :
  2 cc. SO_4H_2 10.N; titrage = 1,85 SO_4H_2 N/20

- vide de 1/2 heure :
  2 cc. SO_4H_2 10.N; titrage = 1,86 SO_4H_2 N/20

ou de l'eau distillée :

- vide de 1/2 heure :
  1 cc. d'eau; titrage = 1,81 SO_4H_2 N/20

- vide de 1/2 heure :
  2 cc. d'eau; titrage = 1,80 SO_4H_2 N/20

Cet ensemble de résultats nous a montré :

1°) qu'il était préférable de mesurer en B le mélange soude - chlorure de baryum dès le début de l'opération : on évite ainsi des manipulations supplémentaires et on écarte d'autant les risques de carbonatation par l'air.

2°) qu'il fallait tenir compte d'erreurs qui paraissaient assez constantes, se produisant pendant l'action du vide ou à la suite de l'introduction de liquides dans l'appareil, et qui semblaient dûes à une fixation de CO_2.

Nous avons donc fait pour chaque dosage un témoin préparé dans les mêmes conditions.

Plusieurs dosages de 0 cc.50 de solution N/10 de carbonate de sodium nous ont alors donné des résultats satisfaisants (en cc. de solution N/20) :

A Valeur du témoin	B Titrage	Différence A - B (Théorie=1cc,00)
1,87	0,88	0,99
1,88	0,88	1,00
1,88	0,89	0,99

De plus nous avons montré l'inutilité de l'emploi, pour le titrage, de solutions d'acide sulfurique ou chlorhydrique N/50 ou N/40. En effet, les milieux où on opère sont toujours troubles : cet aspect rend difficile l'appréciation du virage de la phénolphtaléine lorsque par surcroît la concentration du milieu diminue comme c'est le cas ici. Dès lors le titrage ne se montre pas plus précis qu'avec l'acide N/20 avec lequel on obtient sans aucune hésitation le virage à la goutte, alors qu'il faut plusieurs gouttes avec les solutions plus diluées. D'ailleurs, du point de vue théorique, il y a intérêt à réduire au minimum la dilution finale du milieu où se manifeste le virage.

Enfin nous avons obtenu encore des résultats satisfaisants en opérant sur des doses variables de CO_3Na_2.N/10.

Le mélange de fixation était composé à parties égales de 1 cc. OHNa N/10 décarbonatée et 1 cc. de chlorure de baryum saturé. Dans ces conditions, nous avons obtenu en acide N/20 :

		Chiffre théorique d'après le témoin
Témoin	1,76	-
+ 0,3 CO_3Na_2	1,16	1,16
+ 0,5 "	0,77	0,76
+ 0,7 "	0,41	0,36

Avec 2 cc. de OHNa N/10, nous avions, exprimé en solution N/20 :

		Chiffre théorique
Témoin	3,78	-
+ 0,6 CO_3Na_2 N/20	2,61	2,58
+ 0,8 "	2,24	2,18
+ 1,2 "	1,43	1,38
+ 1,4 "	1,03	0,98

L'ensemble de ces résultats nous a alors conduit à opérer sur le plasma, dans les conditions finales de la réaction.

II - ETUDE DU PLASMA.

Nous avons fait des dosages de la réserve alcaline de plasmas qui nous ont donné les résultats ci-après : la prise d'essai de 1 cc. de plasma était mélangée à 1 cc. de OHNa N/20 décarbonatée au début de l'opération; ainsi tous les bicarbonates se trouvaient fixés à l'état de carbonates, et nous n'avions plus à craindre la perte de CO_2 libre et la libération du CO_2 provenant de la décomposition des bicarbonates sous l'influence de la dépression. Après avoir fait le vide, l'acide sulfurique 10.N était lentement introduit dans l'appareil. Par comparaison avec la méthode gazométrique de VAN SLYKE, nous avons trouvé dans les mêmes conditions :

VAN SLYKE	Volumétrie
56,3	52
57,3	57,1
61,9	57,1
50	48,1
59,1	57,1

Tous ces résultats ne concordaient pas toujours d'une manière satisfaisante. Nous avons pensé que l'introduction du plasma sous de l'eau saturée d'alcool octylique, après avoir fait le vide dans l'appareil comme dans la technique de VAN SLYKE, se-

rait mieux appropriée et qu'il serait possible d'obtenir de meilleurs résultats. Il n'en a rien été, car, dans la plupart des cas, les chiffres obtenus par cette méthode, pour une raison encore inconnue, étaient plus faibles que précédemment :

Volumétrie : introduction du plasma avant de faire le vide :	introduction après avoir fait le vide:
47,6	45,9
44,2	39,7
35,2	33,6
42,5	39,2
35,2	34,1

La technique que nous avions primitivement étudiée sur la solution de CO_3Na_2 semblait en définitive rester la meilleure et rien jusque-là ne paraissait démontrer l'insuffisance d'un tel dosage. Cependant la fixation du CO_2 seule pouvait être mise en cause : en effet, après le brusque dégagement du CO_2, il se formait rapidement à la surface de la soude une pellicule de carbonate de baryum. Celle-ci pouvait s'opposer à la fixation ultérieure des dernières portions de CO_2, toujours plus difficiles à fixer. Aussi nous avons tenté de favoriser la précipitation de ce carbonate de baryum par addition au mélange $OHNa$-Cl_2Ba d'une petite quantité d'alcool à 90°. Dans ces conditions, une légère agitation de l'appareil permettait de détruire facilement la pellicule formée et de favoriser au maximum la fixation du CO_2. L'expérience a confirmé ce fait et le pourcentage des erreurs par défaut est passé de 10 °/. (moyenne sur 13 dosages) à 2,15 °/. (moyenne de 11 dosages). Enfin, dans ces conditions, l'emploi d'alcool octylique comme antimoussant nous a paru préférable à l'eau saturée d'alcool octylique, celle-ci n'empêchant pas toujours la mousse de pénétrer dans le col du ballon A.

L'emploi d'acide sulfurique nous a permis également d'accélérer un peu le titrage final, la formation du sulfate de baryum s'opposant à la décomposition du carbonate de baryum déjà formé, probablement par enrobage.

RESULTATS OBTENUS.

Nous avons systématiquement comparé la méthode que nous avons proposée à la technique gazométrique de VAN SLYKE. Pour cette dernière, nous n'avons tenu compte que des erreurs dûes à la température et à la pression. Dans ces conditions, nous avons obtenu les résultats suivants :

Van Slyke	Technique personnelle	°/. d'erreur par défaut avec le Van Slyke.
43,1	42,5	1,39
35,7	35,2	1,40
49,2	48,2	2,3
52,9	51,5	2,27
50,4	48,7	3,37
52,7	51,5	2,27
51,2	49,8	2,73
58,2	57,1	1,89
50,5	48,7	3,60
26,2	25,7	1,90
44,5	44,2	0,67

ce qui fait au total sur l'ensemble de ces 11 dosages une erreur moyenne par défaut de 2,17 °/..

CONCLUSIONS

Nous avons mis au point une technique de mesure de la réserve alcaline du sang, en adoptant un procédé volumétrique de dosage du gaz carbonique. Ce procédé met en oeuvre d'une part la fixation sous vide au moyen d'un appareil décrit par Mme FIEVET (17) et d'autre part un titrage indirect des carbonates en milieu alcalin au moyen d'une technique dûe à WINCKLER (18). Il présente certaines particularités qui amènent à respecter strictement plusieurs détails opératoires sur lesquels nous avons insisté.

Si on tient compte du pourcentage des erreurs relevées dans le tableau précédent, on voit que les résultats obtenus sont tout à fait comparables à ceux de la méthode de VAN SLYKE.

Nous pensons que cette méthode, dont cependant l'exécution est moins rapide que celle de VAN SLYKE, pourra présenter un intérêt dans les nombreux cas où la fréquence relativement faible de la mesure de la réserve alcaline ne justifie pas la possession d'un appareil de VAN SLYKE à la fois coûteux et fragile.

BIBLIOGRAPHIE

4-11- CREMER (H.D.) - Klin. Woch. 1939-18-1034

5-13- CRISTOL (P.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1929-11-731

2-9- DIBBELT (W.) - Arb. Geb. Pathol. Anat. Bact. 1908-6-228

7-14-17- FIEVET (Y.) - Thèse Doct. Univ. (Pharmacie) Paris 1945

6- FLEURY (P.) - Fiches techniques de chimie biologique - voir Sang 10 - Edit. VEGA, Paris.

15- GROS (R.) - J. Pharm. Chim. 1934-(8)-19-157

12- LANG (K.) - Klin. Woch. 1939-18-913

3-10- NICLOUX (M.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1927-9-758

1- VAN SLYKE (D.D.) - J. biol. Chem. 1917-30-347

8-16-18- WINCKLER (Cl.) - Voir TREADWELL (F.P.) - Kurzes Lehrbuch der analytischen Chemie t.II- Quantitative analyse - IIe édition - 1923 p. 510.

CONCLUSIONS GENERALES

Nous grouperons et résumerons ici les conclusions que nous avons été amenés à formuler à la fin de chacun des chapitres distincts dont l'ensemble représente notre travail.

Chapitre I : Recherche des barbituriques dans l'urine.

L'emploi d'éther de pétrole pour purifier les solutions acétoniques obtenues dans la technique de R. FABRE et CISMARU, réduit les opérations ultérieures. Il est ainsi possible de diminuer considérablement le temps de recherche des barbituriques dans les cas d'intoxications massives.

Chapitre II : Etude des pigments biliaires dans l'urine.

I - Recherche : une technique de KUHN, qui ne paraît pas avoir retenu l'attention, permet d'effectuer très simplement cette recherche; sa spécificité et sa sensibilité sont au moins égales à celles de la technique de GRIMBERT.

II - Dosage de la bilirubine : ce dosage peut compléter utilement la recherche précédente. L'emploi de la diazoréaction nous a amené à étudier des techniques très diverses. Nous préconisons en fin de compte une technique s'inspirant de toutes les remarques recueillies au cours de cette étude.

Chapitre III : Recherche du sang dans l'urine.

Nous avons modifié la technique d'extraction du pigment sanguin selon la méthode de POIROT et LAMBERT. L'entraînement se fait, dans l'urine rendue artificiellement albumineuse, par une précipitation à l'acide tungstique. La caractérisation est faite avec les réactifs au pyramidon et à la teinture de gaiac. La recherche du sang est ainsi simplifiée et accélérée.

Chapitre IV : Recherche et dosage de l'albumine urinaire.

Nous avons examiné, dans ce but, la valeur de la réaction du biuret.

Cette réaction est intéressante pour la recherche, notamment lorsque de faibles doses d'albumine sont présentes dans des urines troubles. Cependant, il y a lieu de ne pas oublier que la pseudo-albumine, les albumines thermo-solubles, ou même le pus donnent également des réactions positives. Il sera ainsi indispensable de les rechercher simultanément.

Le dosage de l'albumine peut se faire facilement par cette réaction. Toutefois elle ne semble pas toujours fidèle et les résultats obtenus sont quelque peu irréguliers. La mesure photométrique se heurte à diverses difficultés; il est délicat d'obtenir une courbe d'étalonnage de l'appareil qui soit valable dans tous les cas. L'emploi de cette réaction, qui n'est pas rigoureusement spécifique, se trouve, de ce fait, réduit.

Chapitre V : Détermination de la réserve alcaline du sang.

Nous avons mis au point une technique de détermination titrimétrique de la réserve alcaline, technique inspirée des méthodes classiques de dosage de l'anhydride carbonique qui, après déplacement, est fixé par une solution titrée de baryte. Cette technique est réalisable au moyen d'un appareillage assez simple.

Dans l'ensemble, nous avons eu comme but principal la mise au point de techniques simples, précises, rapides. Nous avons également tenu à ce qu'elles puissent être facilement reproduites dans les laboratoires d'analyses médicales.

TABLE DES MATIERES

	Pages
Introduction.....	1
Chapitre I - Recherche des barbituriques dans l'urine.....	3
Technique proposée.....	6
Etude critique et justification du procédé.....	8
Conclusions.....	13
Bibliographie.....	14
Chapitre II -	
I - Recherche des pigments biliaires dans l'urine.....	17
Techniques étudiées.....	20
Etude critique.....	21
Conclusions.....	24
Bibliographie.....	24
II - Dosage de la bilirubine dans l'urine...	26
Etude de la diazoréaction.....	27
Etude de l'extraction de la bilirubine.....	37
Etude critique de ces techniques.....	40
Technique proposée.....	41
Conclusions.....	43
Bibliographie.....	44
Chapitre III - Recherche du sang dans l'urine.	45
Méthode utilisée.....	48
Résultats obtenus.....	50
Conclusions.....	51
Bibliographie.....	51
Chapitre IV - Recherche et dosage de l'albumine dans l'urine.....	53
I - Recherche qualitative de l'albumine urinaire.....	58
Technique de recherche de l'albumine.	59
Justification de la technique.....	61
Conclusions.....	65

Pages

II - Dosage de l'albumine urinaire..... 65
Technique proposée..... 65
Etude de la méthode..... 66
Conclusions..... 73

- Note sur la conservation des solutions d'albumine..... 73
Conclusions..... 75
Bibliographie..... 76

Chapitre V - Détermination de la réserve alcaline du sang..... 82
Technique proposée..... 87
Etude critique et justification de la technique..... 89
Résultats obtenus..... 96
Conclusions..... 96
Bibliographie..... 97

Conclusions générales..... 98

Vu :

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

R. FABRE.

Vu :

Le Président de la Thèse,

P. FLEURY.

Vu et permis d'imprimer, le 10 Février 1948.

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Le Vice-Président du Conseil
de l'Université de Paris,

A. CHOLLEY.